

**Universidad Pública de Navarra  
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIEROS AGRÓNOMOS**



**MEJORA DE LA BIOACCESIBILIDAD Y ESTABILIDAD DEL RESVERATROL  
MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS  
Y COMPLEJOS BIOPOLIMÉRICOS**

presentado por

**SONIA PÉREZ CIORDIA**

**MÁSTER EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD EN  
LAS INDUSTRIAS AGROALIMENTARIAS**

Junio, 2015

## Contenido

Resumen .....	7
Abstract .....	8
1. Introducción .....	9
1.1 Resveratrol .....	9
1.1.1 Estructura química del resveratrol.....	9
1.1.2 Estabilidad del resveratrol.....	10
1.1.3 Fuentes en la naturaleza .....	11
1.1.4 Propiedades beneficiosas para la salud y biodisponibilidad.....	12
1.2 Alimentos funcionales.....	14
1.2.1 Definición. Historia. Importancia.....	14
1.2.2 Estudio de mercado de los alimentos funcionales.....	16
1.3 La encapsulación en la industria alimentaria .....	22
1.3.1 Método de precipitación anti-solvente .....	25
1.3.2 Materiales de pared .....	27
1.3.3 Zeína.....	29
1.4 La reacción de Maillard.....	32
1.4.1 Etapas de la reacción de Maillard.....	32
1.4.2 Influencia de las condiciones de reacción .....	35
1.4.3 Formación de conjugados de Maillard .....	35
1.5 Digestión <i>in vitro</i> .....	36
1.5.1 Parámetros de la digestión <i>in vitro</i> .....	38
1.6 Nanoencapsulación del resveratrol.....	40
2. Objetivos .....	41
2.1 Objetivo general .....	41
2.2 Objetivos específicos.....	41
3. Materiales y métodos .....	42
3.1 Materiales .....	42
3.2 Proceso de conjugación por la reacción de Maillard.....	42
3.3 Estimación de la extensión de la conjugación.....	43
3.3.1 Prueba de orto-ftaldehído (OPA) .....	43
3.3.2 Turbidez .....	44
3.3.3 Pardeamiento.....	44
3.4 Cuantificación de resveratrol .....	44
3.5 Solubilidad del resveratrol .....	44

3.6 Método de producción de nanopartículas.....	45
3.7 Eficiencia de encapsulación .....	45
3.8 Caracterización de las nanopartículas. ....	46
3.9 Estabilidad a luz ultravioleta .....	47
3.10 Digestión <i>in vitro</i> .....	47
3.11 Análisis estadístico.....	49
4. Resultados y discusión .....	51
4.1 Cinética del proceso de conjugación .....	51
4.2 Solubilidad del resveratrol .....	54
4.3 Eficiencia de encapsulación .....	56
4.4 Pruebas estabilidad UV .....	58
4.5 Tamaño y potencial zeta de las nanopartículas de zeína. ....	59
4.6 Seguimiento de la digestión <i>in vitro</i> .....	61
4.6.1 Fase gástrica .....	61
4.6.2 Fase intestinal .....	63
4.6.3 Digestión para el tratamiento conjugado con zeína.....	65
4.7 Bioaccesibilidad .....	66
5. Conclusiones .....	69
6. Bibliografía .....	70

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura química del <i>trans</i> -resveratrol y el <i>cis</i> -resveratrol .....	9
<b>Figura 2.</b> Principales mercados de alimentos funcionales en el mundo .....	17
<b>Figura 3.</b> Distribución europea de mercado de los alimentos funcionales .....	17
<b>Figura 4.</b> Comparativa del crecimiento mundial y español en el mercado de los alimentos funcionales en el periodo 1994-2005 .....	18
<b>Figura 5.</b> Nuevos productos lanzados al mercado a nivel europeo con declaraciones funcionales.....	19
<b>Figura 6.</b> Lanzamiento de alimentos con declaraciones funcionales .....	19
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de compra en función de las propiedades funcionales de los alimentos en el mercado español.....	20
<b>Figura 8.</b> Ventas de alimentos funcionales por Comunidades en España .....	21
<b>Figura 9.</b> Previsiones en la evolución del mercado de los alimentos funcionales.....	21
<b>Figura 10.</b> Estudio del incremento de los costes de salud .....	22
<b>Figura 11.</b> Estructura de una nanocápsula .....	23
<b>Figura 12.</b> Representación de la morfología de los diferentes tipos de cápsulas .....	23
<b>Figura 13.</b> Representación de las etapas del método de precipitación antisolvente .....	26
<b>Figura 14.</b> Diagrama de tres fases para la solubilidad de la zeína en etanol y agua .....	30
<b>Figura 15.</b> Formación de glicosamina y reestructuración de Amadori .....	33
<b>Figura 16.</b> Degradación de Strecker .....	34
<b>Figura 17.</b> Formación de compuestos aromáticos heterocíclicos .....	34
<b>Figura 18.</b> Enfoque generalizado para el diseño de formulaciones y procesos para la estabilización y mejora de la biodisponibilidad de un bioactivo .....	37

<b>Figura 19.</b> Mini Spray Dryer B-191 de Büchi y a la derecha el esquema de los componentes del equipo .....	43
<b>Figura 20.</b> Equipo Zetasizer 3000 .....	46
<b>Figura 21.</b> Cámara ultravioleta .....	47
<b>Figura 22.</b> Esquema del proceso de determinación de la bioaccesibilidad mediante el método de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	49
<b>Figura 23.</b> Cinética en la formación de conjugados .....	51
<b>Figura 24.</b> Evolución de la turbidez durante el proceso de conjugación caseinato-dextrano mediante la reacción de Maillard.....	52
<b>Figura 25.</b> Evolución de la turbidez a través de la utilización del turbidímetro en el proceso de conjugación caseinato-dextrano mediante la reacción de Maillard.....	52
<b>Figura 26.</b> Evolución de la leucina restante en la prueba de orto-ftaldehído (OPA).....	53
<b>Figura 27.</b> Evolución del pardeamiento durante el proceso de conjugación mediante la medición de la absorbancia a 420 nm.....	54
<b>Figura 28.</b> Solubilidad del resveratrol a diferentes concentraciones .....	55
<b>Figura 29.</b> Solubilidad de diferentes concentraciones de GSE en la solución de conjugados .....	56
<b>Figura 30.</b> Eficiencia de encapsulación en los tratamientos empleados .....	57
<b>Figura 31.</b> Cantidad de <i>trans</i> -resveratrol restante (%) en las pruebas de estabilidad .....	58
<b>Figura 32.</b> Diámetro medio de partícula e índice de polidispersidad (PDI) para los tratamientos con nanopartículas con zeína .....	60
<b>Figura 33.</b> Potencial zeta (mV) para los tratamientos con nanopartículas con zeína .....	61
<b>Figura 34.</b> Diámetro medio de partícula e índice de polidispersidad (PDI) para los tratamientos con nanopartículas con zeína en la fase gástrica .....	62

<b>Figura 35.</b> Potencial zeta (mV) para los tratamientos con nanopartículas con zeína en la fase gástrica .....	63
<b>Figura 36.</b> Diámetro medio de partícula e índice de polidispersidad (PDI) para los tratamientos con nanopartículas con zeína en la fase intestinal .....	64
<b>Figura 37.</b> Potencial zeta (mV) para los tratamientos con nanopartículas con zeína en la fase intestinal .....	65
<b>Figura 38.</b> Etapas de la digestión con sales biliares y con pancreatina para el tratamiento conjugado con zeína .....	66
<b>Figura 39.</b> Bioaccesibilidad del resveratrol (%) .....	67

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Principales fuentes del resveratrol en la dieta y contenido medio .....	11
<b>Tabla 2.</b> Materiales de pared empleados en la encapsulación de alimentos .....	28
<b>Tabla 3.</b> Composición de aminoácidos de la zeína .....	29
<b>Tabla 4.</b> Propiedades de la zeína .....	31
<b>Tabla 5.</b> Concentraciones de los constituyentes para el fluido gástrico (SGF) e intestinal (SIF) .....	48

## Resumen

El resveratrol es un compuesto polifenólico presente en la piel de la uva que se ha informado que aporta numerosos beneficios para la salud. Sin embargo, este compuesto presenta inestabilidad y además, muestra baja bioaccesibilidad y escasa solubilidad en agua. En el presente estudio se ha evaluado el efecto de la encapsulación en la biodisponibilidad y estabilidad UV mediante la formación de complejos biopoliméricos y nanopartículas biopoliméricas por el método de precipitación antisolvente. En el primer caso, el resveratrol fue cubierto de caseinato o caseinato-dextrano y en el segundo proceso, el resveratrol y la zeína se encontraban rodeados de caseinato o caseinato-dextrano. Los conjugados caseinato-dextrano fueron obtenidos mediante la reacción de Maillard. Los resultados mostraron que los diferentes tratamientos empleados protegían al resveratrol e incrementaban su bioaccesibilidad, pero la mayor efectividad fue proporcionada por las nanopartículas biopoliméricas.

Palabras clave: *Resveratrol, Encapsulación, Bioaccesibilidad, Reacción de Maillard, Precipitación antisolvente.*



## Abstract

Resveratrol is a polyphenolic compound in grape skin that has been reported to have numerous health benefits. However, this compound shows instability and also, low bioaccessibility and poor water solubility. In this current study, we assessed the encapsulation effect in bioaccessibility and UV stability through the formation of biopolymer complexes and biopolymer nanoparticles by antisolvent precipitation. In the first case, resveratrol was covered with caseinate or caseinate-dextran, and in the second process, resveratrol and zein were coated in caseinate or caseinate-dextran. The caseinate-dextran conjugated were obtained by the Maillard reaction. The results showed that the different treatments protected to resveratrol and increased bioaccessibility, but the most effectiveness was the biopolymer nanoparticles.

**Keywords:** *Resveratrol, Encapsulation, Bioaccessibility, Maillard Reaction, Antisolvent precipitation.*

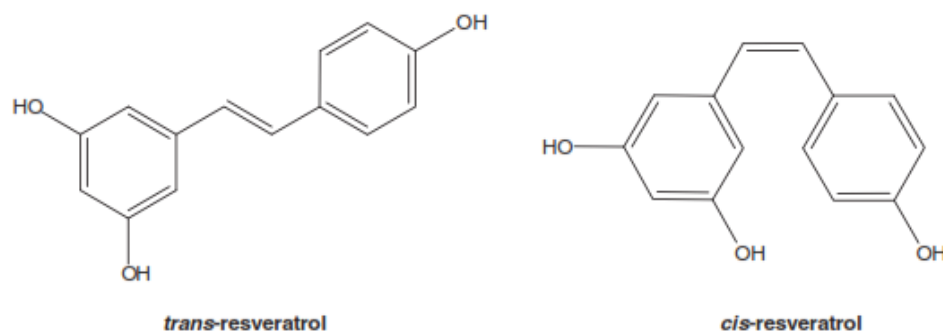
# 1. Introducción

## 1.1 Resveratrol

### 1.1.1 Estructura química del resveratrol

El resveratrol (trans-resveratrol; trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) (peso molecular: 228,25 g/mol) es un compuesto polifenólico natural perteneciente a la familia de los estilbenos que se encuentra en productos alimentarios como la piel de la uva, los cacahuets y las ostras. Su estructura química no fue caracterizada hasta 1940 por Takaoka, quien logró aislarlo de las raíces de *Veratrum grandiflorum*. Su estructura base consiste en la unión de dos anillos fenólicos por un doble enlace estireno. Este doble enlace es el responsable de las formas isoméricas *cis* y *trans* del resveratrol (figura 1). Desde el punto vista estérico es más estable el isómero *trans* (Gambini, 2013).

La estructura química del resveratrol hace que tenga poca solubilidad en agua (< 0,05 mg/ml), lo cual puede afectar a su bioaccesibilidad. La solubilidad del resveratrol se incrementa en etanol (50 mg/ml) o solventes orgánicos como dimetil sulfoxido (DMSO) (16 mg/ml) (Gambini, 2013). Además, el resveratrol es soluble de forma moderada en aceites de triglicéridos (0,18 mg/ml) (Davidov-Pardo, 2014).



**Figura 1.** Estructura química del *trans*-resveratrol y el *cis*-resveratrol (Gambini, 2013).

### 1.1.2 Estabilidad del resveratrol

En general, los polifenoles son muy fotosensibles a la luz solar, se oxidan fácilmente en presencia de oxígeno, se descomponen a altas temperaturas y no son muy estables frente a las variaciones de pH (Lucas Abellán, 2009). Por estos motivos, es difícil mantener las concentraciones de polifenoles en los alimentos durante su almacenamiento, por lo que se hacen imprescindibles los estudios de estabilidad para la determinación de las condiciones idóneas de almacenamiento del alimento.

Estudios de estabilidad indican que el resveratrol es muy inestable frente a algunos agentes externos como el aire, la luz y las enzimas oxidativas que pueden provocar la oxidación y una conversión, inducida por la luz, del isómero *trans*- al *cis*-provocando la reducción de su bioactividad (Bitencourt, 2012).

La exposición del *trans*-resveratrol a la luz UV, a temperatura ambiente y en presencia de oxígeno produce una transformación muy rápida de *trans*- a *cis*-resveratrol. La velocidad del aumento en la primera hora de la exposición es del 0,5 % al 1 % por minuto (Lucas Abellán, 2009). La *cis*-isomerización puede ocurrir cuando la isoforma *trans*- es expuesta a la luz solar o artificial o a la radiación ultravioleta a 254 nm de longitud de onda o 365 nm. Sin embargo, los datos indican que ambos isómeros pueden tener efectos biológicos distintos (Gambini, 2013). Cuando se protege la forma *trans*- de la luz solar puede durar hasta un mes de forma estable, sin embargo la forma *cis*- del resveratrol no es estable aun protegiéndolo de la luz, a no ser que se encuentre a un pH neutro (Romero-Pérez, 1996).

También se han realizado estudios de estabilidad en función de las temperaturas de almacenamiento. Cuando se conservó el resveratrol a 4 °C, éste se mantuvo estable durante los primeros cinco días. Cuando las muestras de resveratrol disueltas fueron almacenadas a temperatura ambiente y en oscuridad, la concentración de resveratrol disminuyó un 88 % (Bertacche, 2006).

### 1.1.3 Fuentes en la naturaleza

El resveratrol se encuentra presente en varios frutos como los arándanos (*Vaccinium spp.*), la grosella (*Vaccinium spp.*), las moras (*Morus spp.*) y los cacahuets (*Arachis hypogaea*). Otro alimento rico en este componente es el vino tinto, el cual aporta el mayor contenido de este compuesto a nuestro tipo de dieta. El contenido en resveratrol del vino procede de las uvas, en concreto de su piel. La piel de uva fresca contiene de 50 a 100 µg/g de *trans*-resveratrol (Hendler, 2001). Por este motivo, el vino tinto es más rico en comparación con el vino blanco, ya que durante la obtención del tinto se maceran las partes de la uva en las que se encuentra el resveratrol, a diferencia de la obtención del blanco en las que se desechan dichas partes. Por la misma razón, la concentración de resveratrol en vinos rosados es intermedia a la encontrada en blancos y tintos (tabla 1). Además, el alcohol que se produce en la fermentación de la uva favorece su solubilidad y por tanto su extracción.

**Tabla 1.** Principales fuentes del resveratrol en la dieta y contenido medio (Lucas Abellán, 2009).

Fuente dietética	Concentración media de <i>trans</i> -resveratrol (mg/kg)	Referencias
<b>Arándanos</b>	0,02	Lyons, 2003
<b>Zumo de arándano rojo</b>	0,2	Wang, 2002
<b>Mantequilla de cacahuete</b>	0,3	Burns, 2002
<b>Cacahuete</b>	0,3	Burns, 2002
<b>Pistacho</b>	1,7	Tokusoglu, 2005
<b>Chocolate negro</b>	2	Counet, 2006
<b>Uva de mesa</b>	0,7	Cantos, 2000
<b>Zumo de uva</b>	0,5	Romero-Pérez, 1999
<b>Vino blanco</b>	0,13	Carando, 1999
<b>Vino rosado</b>	0,4	Carando, 1999
<b>Vino tinto</b>	1,9	Stervbo, 2007

La concentración de resveratrol en vinos es enormemente variable dependiendo de la variedad de uva, región geográfica, tipo de suelo, condiciones climáticas, prácticas enológicas, etc. (Bavaresco, 2003). El isómero más abundante es el *trans*-resveratrol y aunque también se ha identificado *cis*-resveratrol en el vino, este no se ha encontrado en el extracto de uva, por lo que la síntesis de *cis*-resveratrol tiene lugar durante el proceso de vinificación, posiblemente mediante la acción de la luz ultravioleta (Elíes-Gómez, 2009).

La presencia de resveratrol está documentada también en algunos árboles como el eucalipto y el abeto, y el árbol tropical de hoja caduca *Bauhinia racemosa*. También se ha identificado en algunas plantas con flor, concretamente en *Veratrum grandiflorum* y *Veratrum Formosanum*, que son capaces de sintetizar este compuesto.

#### 1.1.4 Propiedades beneficiosas para la salud y biodisponibilidad

Diversos estudios han demostrado que el resveratrol es un potente antioxidante, quimioprotector y antiinflamatorio (Bitencourt, 2012). Entre sus beneficios en la salud humana, también destaca los efectos protectores contra las enfermedades cardiovasculares y en concreto, el cáncer, incluyendo todas las etapas de la carcinogénesis: iniciación, promoción y progresión (Walle, 2004). Las investigaciones que se han realizado han sugerido que el resveratrol ayuda a modular la inflamación, la diabetes y la obesidad (Augustin, 2013). El resveratrol resulta activo frente al cáncer de colon, pulmón, mama, estomago, próstata, piel, esófago, tiroides, páncreas, ovario, hígado y leucemia (Lucas Abellán, 2009). También se ha demostrado que mejora la resistencia del organismo frente al estrés, tiene efecto antienvjecimiento y prolonga el tiempo de vida en números organismos, desde levaduras (Howitz, 2003) hasta vertebrados (Baur, 2006).

También se ha estudiado la actividad neuroprotectora del resveratrol, demostrando que disminuye el estrés oxidativo en células neuronales, y reduce por tanto la toxicidad de los radicales libres (Tredici, 1999). Varios estudios en modelos animales sugieren que el resveratrol puede reducir la incidencia de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad del Alzheimer y la enfermedad del Parkinson (Anekonda, 2006).

Se ha indicado que el resveratrol presenta una función estrogénica, ya que es un análogo estructural del estrógeno sintético dietilestilbestrol (DES), pudiendo actuar de forma dosis-dependiente, como agonista estrogénico o antagonista en presencia de estrógenos, lo que permite la inhibición de células cancerígenas de mama (Lu, 1999).

El resveratrol también posee efecto antiinflamatorio al inhibir enzimas que son claves en las rutas metabólicas de prostaglandinas y eicosanoides, compuestos responsables de la respuesta inflamatoria (Jang, 1997).

En la literatura se ha descrito que además, el resveratrol presenta actividad antibacteriana y antivírica. Inhibe el crecimiento de bacterias de forma selectiva pero no es efectivo frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis* (Mahady, 2000). Por otro lado en cuanto a su actividad antivírica, inhibe de forma reversible y dosis-dependiente, la replicación de los virus herpes simple (HSV-1 y HSV-2) (Docherty, 1999) y además, potencia la acción de algunos fármacos usados contra el virus del SIDA (VIH-1) sin mostrar efectos tóxicos para las células (Heredia, 2000).

Uno de los puntos clave de la efectividad del resveratrol es su biodisponibilidad. El resveratrol presenta una baja biodisponibilidad, que se ha asociado a su baja solubilidad en agua, su baja estabilidad contra el estrés ambiental, y su incapacidad para alcanzar un sitio diana en el cuerpo para ejercer el efecto deseado para la salud (Augustin, 2013). Aunque los niveles circulatorios de los compuestos fenólicos como el resveratrol puede ser baja después de la administración oral, se debe considerar la influencia de la microflora intestinal sobre la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos (Augustin, 2013). Estos compuestos se acumulan en el colon (Clifford, 2004), donde son metabolizados por la microbiota intestinal, dando lugar a una serie de ácidos fenólicos, que pueden tener mayor actividad a nivel fisiológico que los precursores (Monagas, 2010; Williamson, 2010), y que también pueden ser absorbidos, aumentando de esta manera biodisponibilidad (Aura, 2008; Selma, 2009).

Debido a las propiedades benéficas para la salud humana y su actividad antimicrobiana y antioxidante, el resveratrol es una molécula con grandes expectativas a nivel farmacéutico y además, presenta especial interés como aditivo para el desarrollo de alimentos funcionales.

## 1.2 Alimentos funcionales

### 1.2.1 Definición. Historia. Importancia.

El concepto de alimentos funcionales nació en Japón en la década de los 80. Como consecuencia del incremento de la esperanza de vida de la población japonesa y, por tanto del gasto sanitario, el gobierno se planteó la necesidad de crear alimentos que garantizaran una mejor calidad de vida y aportasen un efecto positivo sobre la salud (Jürgens, 2007).

No existe una definición concreta que sirva para catalogar a este tipo de alimentos, incluso puede haber variaciones dependiendo del país y del contexto. Sin embargo, todas las definiciones coinciden en que los alimentos funcionales contienen ciertos elementos que, con un consumo diario y con una dieta equilibrada, proporcionan un efecto beneficioso para la salud (Consejo Europeo de Información sobre alimentación EUFIC). Los alimentos funcionales pueden formar parte de la dieta de cualquier persona, pero están especialmente destinados para aquellos grupos de la población con necesidades nutricionales especiales tales como:

- Embarazadas y niños.
- Estados carenciales.
- Intolerancias a determinados alimentos.
- Colectivos con riesgos de determinadas enfermedades (cardiovasculares, gastrointestinales, osteoporosis, diabetes).
- Personas mayores.

Un alimento funcional puede ser un alimento natural, un alimento al que se ha añadido un componente, o un alimento al que se le ha quitado un componente mediante medios tecnológicos o biológicos. También, puede tratarse de un alimento en el que se ha modificado la naturaleza de uno o más de sus componentes, o en el que se ha modificado la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes, o cualquier combinación de estas posibilidades. Un grupo de expertos coordinados por ILSI (International Life Sciences Institute) elaboró el primer documento europeo con términos científicos sobre alimentos funcionales (Fernández, 2009). Según este documento de 1999, *"un alimento funcional es aquel que contiene un componente, nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre*

*una o varias funciones del organismo, con un efecto añadido por encima de su valor nutricional y, cuyos efectos positivos, justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional o incluso saludable".*

Los alimentos funcionales deben cumplir unos requisitos fundamentales para su denominación, desarrollo y comercialización. Éstos se encuentran regulados por la Unión Europea en el Reglamento (CE) N° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos (Barberá Mateos, 2013). Las características fundamentales que debe cumplir un alimento para considerarse funcional son:

- Se trata de un alimento convencional o de uso diario. No son comprimidos, ni cápsulas, ni ninguna otra forma de suplemento alimenticio.
- Se consumen como parte de una dieta normal o usual.
- Están compuestos por componentes naturales aunque es posible que se encuentren en concentraciones no naturales o en alimentos que normalmente no los contienen.
- Ejercen un efecto positivo en funciones orgánicas, más allá de su valor nutritivo básico.
- Mejoran el estado de salud y/o reducen el riesgo de enfermedad, o aportan beneficios para la salud, como la mejora de la calidad de vida, que incluye el rendimiento físico, psicológico y de comportamiento.

La Unión Europea ha creado una Comisión Europea de Acción Concertada sobre Bromatología Funcional en Europa (Functional Food Science in Europe, FUFOSE). Este programa ha sido coordinado por el Instituto Internacional de Ciencias Biológicas (International Life Sciences Institute (ILSI) Europe) y, su objetivo principal, es establecer un enfoque científico sobre las pruebas que se necesitan para respaldar el desarrollo de productos alimenticios, que puedan tener un efecto beneficioso sobre una función fisiológica del cuerpo y mejorar el estado de salud y bienestar de un individuo y/o reducir el riesgo de que desarrolle enfermedades.

Las seis áreas en las que el proyecto FUFOSE se centró fueron las siguientes: crecimiento, desarrollo y diferenciación, metabolismo, defensa contra especies oxidativas reactivas, alimentos funcionales y el sistema cardiovascular, fisiología y función gastrointestinal, y los efectos de los alimentos o comportamiento y efecto psicológico.



La Acción concertada de la UE apoya el desarrollo de los dos tipos de alegaciones de salud, que se indican a continuación.

- TIPO A: Alegaciones de "funcionales de mejora" asociadas a determinadas funciones fisiológicas y psicológicas y a actividades biológicas que van más allá de su papel establecido en el crecimiento, el desarrollo y otras funciones normales del cuerpo.
- TIPO B: Alegaciones de "reducción de riesgo de enfermedades", que se asocian al consumo de un alimento o de sus componentes para ayudar a reducir el riesgo de padecer una determinada enfermedad o afección, gracias a los nutrientes específicos que contenga o no contenga dicho alimento.

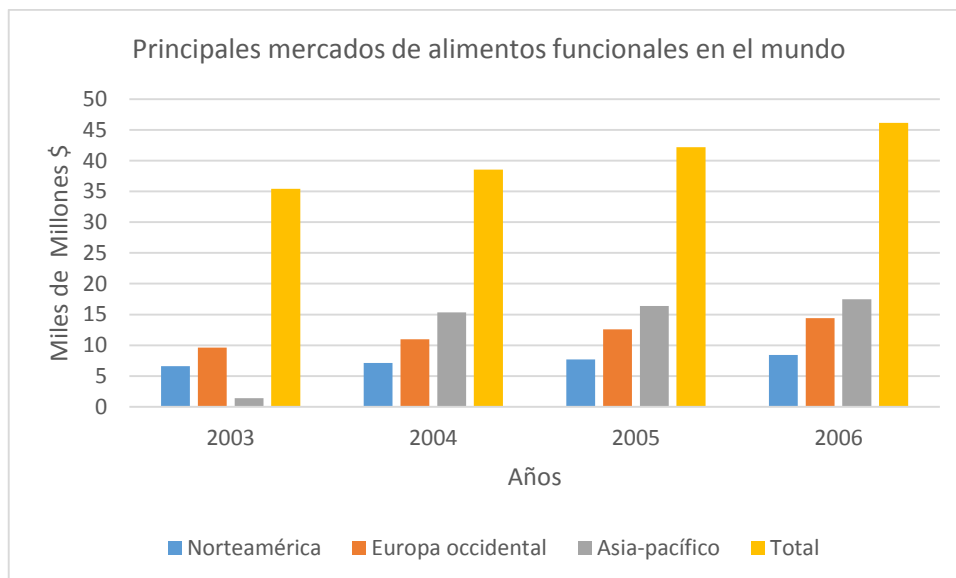
Para poner en práctica los principios del proyecto FUFOSÉ se creó un nuevo programa de Acción Concertada de la Comisión Europea, llamado “Proceso para la Valoración de Soporte Científico de las Alegaciones con respecto a los Alimentos” (Process for the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods, PASSCLAIM), cuyo objetivo es resolver los temas relativos a validación y verificación científica de alegaciones y la información al consumidor.

### 1.2.2 Estudio de mercado de los alimentos funcionales

En este apartado se comentan las tendencias actuales de los alimentos funcionales, las pautas de consumo y el ritmo de lanzamiento de alimentos de este tipo.

- Mercado mundial de alimentos funcionales

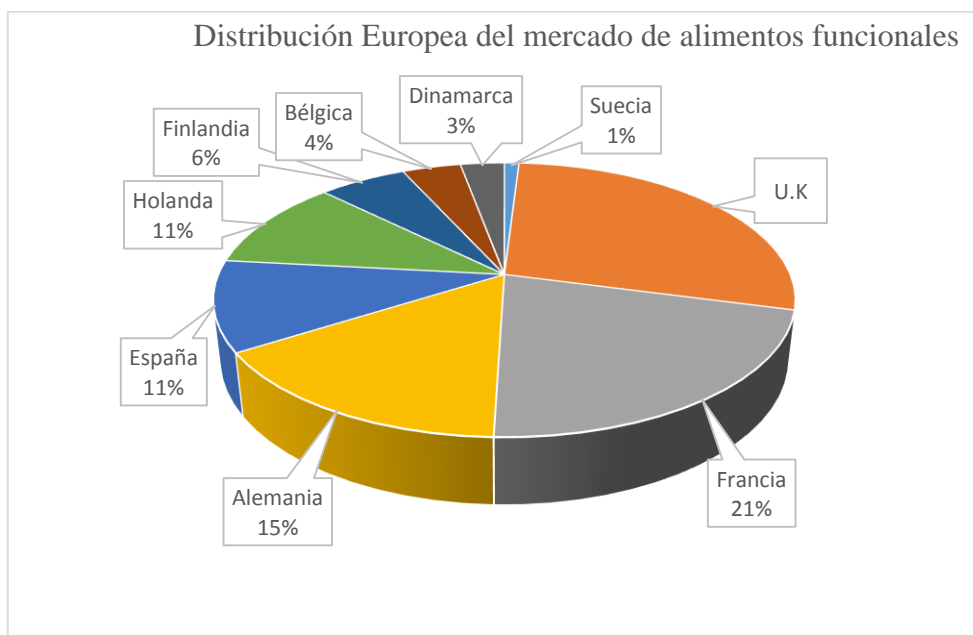
Se ha producido una evolución mundial de los alimentos funcionales en los últimos años. Los principales consumidores de este tipo de productos son Japón, Europa y Estados Unidos (figura 2).



**Figura 2.** Principales mercados de alimentos funcionales en el mundo (Unzue, 2011).

- Desarrollo de alimentos y bebidas funcionales en Europa

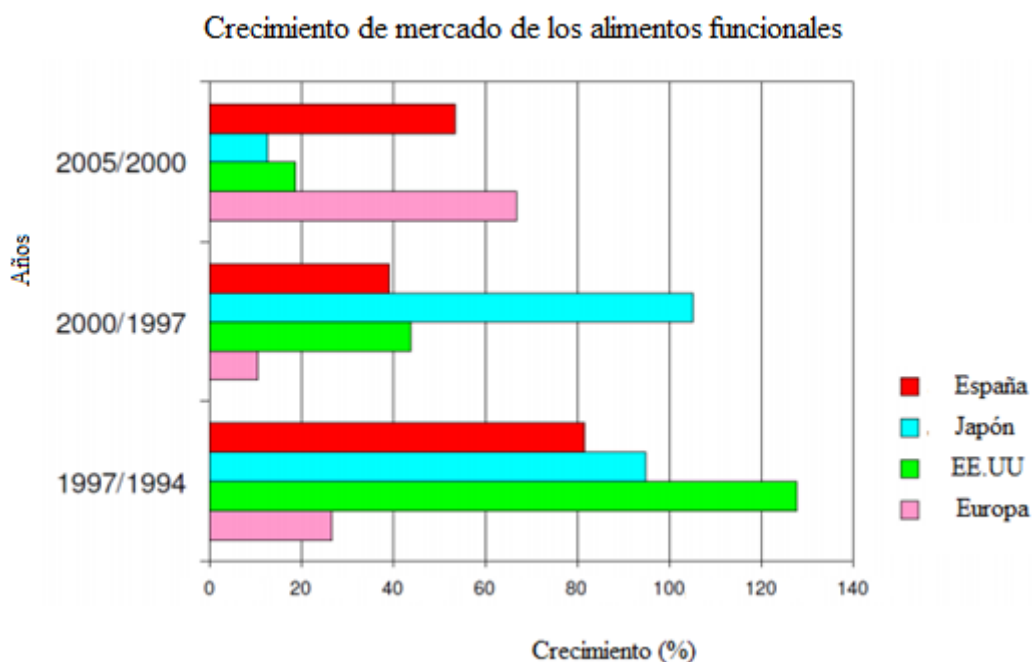
La figura 3 muestra la distribución europea del mercado de los alimentos funcionales. Entre los primeros puestos se encuentran Reino Unido con un 28 % y Francia con un 21 %. A estos países les siguen Alemania (15 %) y España (11 %). Por tanto, España es el cuarto mayor consumidor europeo, dejando atrás a países como Holanda y Finlandia. Por el contrario, Suecia se posiciona en el último lugar en el desarrollo de alimentos funcionales.



**Figura 3.** Distribución europea de mercado de los alimentos funcionales (Unzue, 2011).

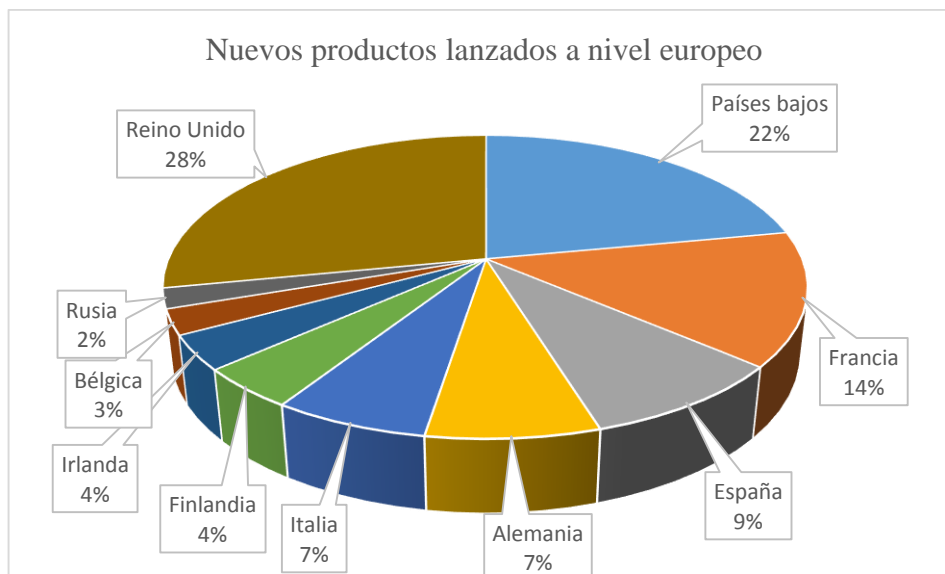
- Nuevos productos con declaraciones funcionales lanzados al mercado

El crecimiento de los alimentos funcionales en el periodo 1994-2005 se muestra en la figura 4. Se observa que en los primeros años de estudio, se encuentran en cabeza Estados Unidos y Japón, sin embargo en Europa el crecimiento no es tan notable, en cambio en España, el crecimiento de este periodo es de más del 80 %. En el segundo periodo (1997-2000) de estudio, Estados Unidos no mantiene el crecimiento tan significativo del periodo anterior. En esta etapa destaca Japón, mientras que Europa en esta ocasión tuvo un crecimiento de alrededor del 10 % y España continúa siendo superior con un incremento cercano al 40%. Para finalizar, en la última fase analizada (2000-2005), el crecimiento de Europa es el más notable, con un incremento superior al 60 %, mientras que Japón y Estados Unidos no superan el 20 %. En esta etapa también es destacable la evolución del crecimiento de mercado de los alimentos funcionales en España.



**Figura 4.** Comparativa del crecimiento mundial y español en el mercado de los alimentos funcionales en el periodo 1994-2005 (Unzue, 2011).

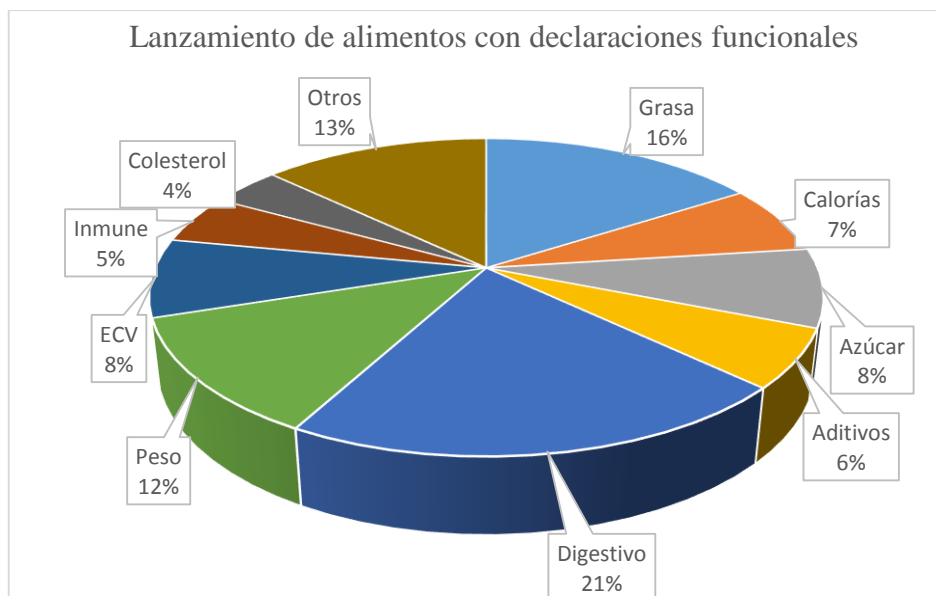
La figura 5 indica que Reino Unido y Países bajos son los países con mayor número de lanzamientos al mercado de nuevos productos con declaraciones funcionales. Se observa que España se sitúa en el cuarto lugar (9%).



**Figura 5.** Nuevos productos lanzados al mercado a nivel europeo con declaraciones funcionales.

Fuente: proyecto de foodme-hop.

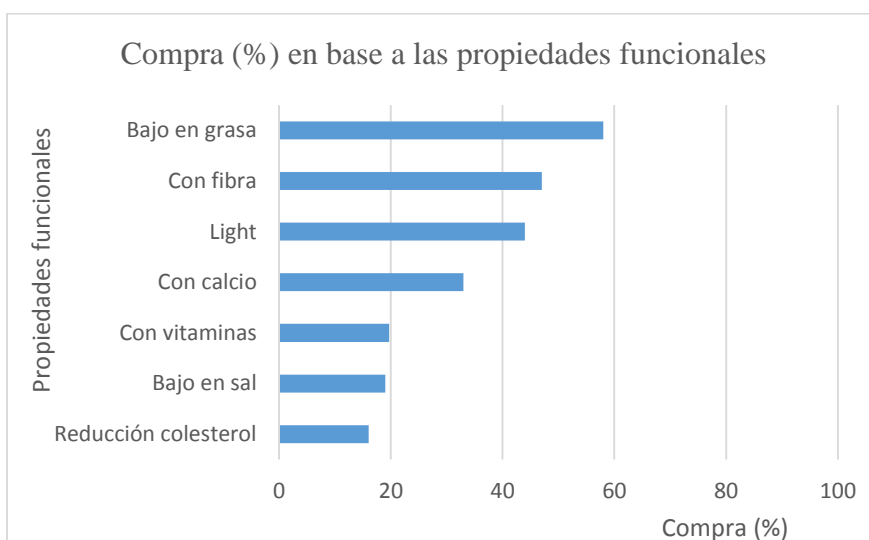
Los alimentos con declaraciones funcionales relacionadas con el aparato digestivo son los que han tenido un mayor número de lanzamientos a nivel global (21%), con un incremento acusado a partir del 2007, seguido por los que afectan a declaraciones sobre el tipo de grasa y control de peso (figura 6).



**Figura 6.** Lanzamiento de alimentos con declaraciones funcionales (Morán, 2010).

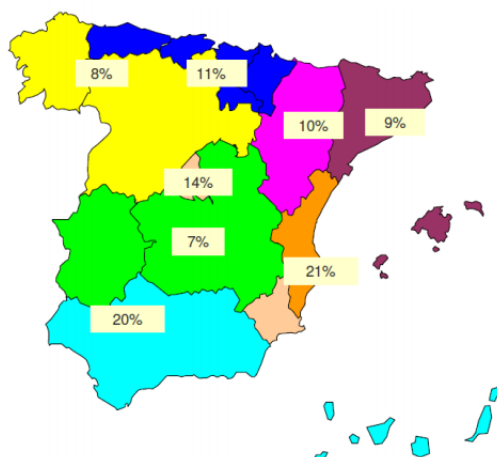
- Mercado funcional en España.

Respecto a los datos de consumo en España, el gráfico siguiente hace referencia al porcentaje de compra de alimentos funcionales de los consumidores españoles. Según las estadísticas, los alimentos que más se compran son aquellos bajos en grasa y los que contienen fibra. Este estudio también indicó que los hogares españoles compran cada vez más alimentos funcionales (figura 7).



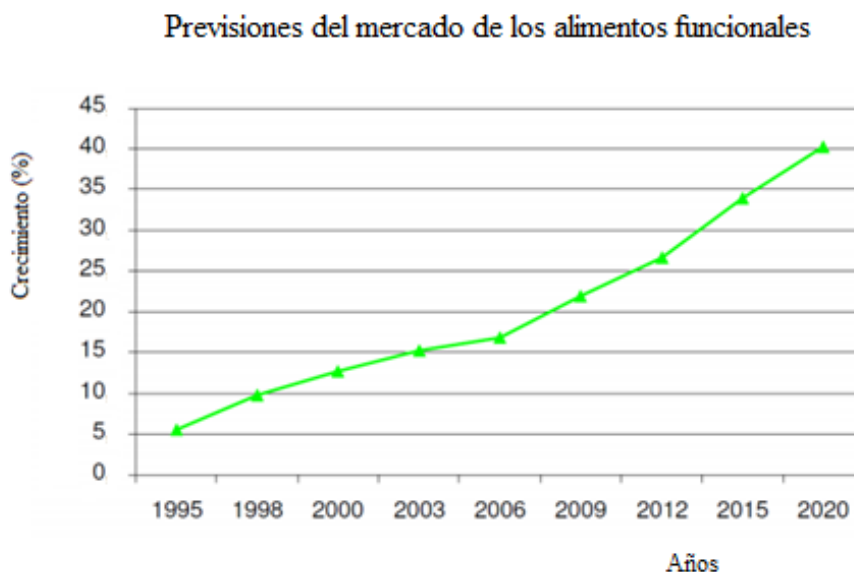
**Figura 7.** Porcentaje de compra en función de las propiedades funcionales de los alimentos en el mercado español. (Morán, 2010).

El estudio de las ventas de los alimentos funcionales por las Comunidades en España (figura 8) indica que las que consumen más en este tipo de productos son Valencia (21 %), Andalucía e Islas Canarias (20 %), seguido de Madrid (14 %) y el norte cantábrico (11 %). Por el contrario, en las zonas que menos se consumen los alimentos funcionales son Castilla y León y Galicia (8 %) y Castilla la Mancha y Extremadura (7 %).



**Figura 8.** Ventas de alimentos funcionales por Comunidades en España Fuente: (Unzue, 2011).

En los estudios de mercado que se han realizado para los alimentos funcionales han dado una previsión sobre su evolución en los próximos años (figura 9).

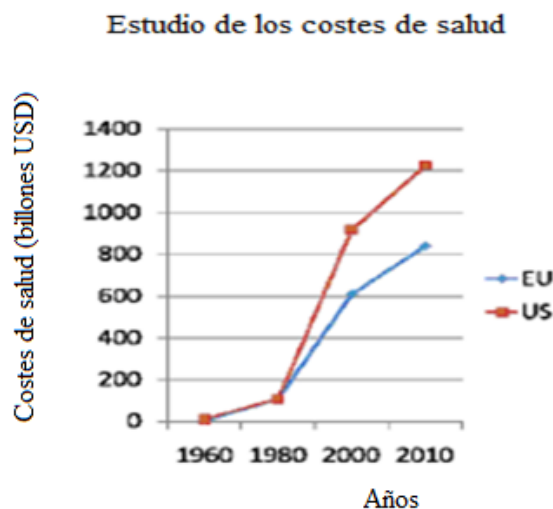


**Figura 9.** Previsiones en la evolución del mercado de los alimentos funcionales (Unzue,2011).

- Aumento de los costes de salud. Tendencia saludable

En los últimos años se ha producido un incremento relacionado con los costes de la salud, tal y como se muestra en la figura 10. Además, y como consecuencia de este incremento en el gasto sanitario, existe una tendencia muy alta a la prevención, como una medida para evitar este gasto. Es por ello que existen previsiones muy claras a

que se potenciará el crecimiento y el consumo de los alimentos con declaraciones de salud (figura 9).



**Figura 10.** Estudio del incremento de los costes de salud (Morán, 2010).

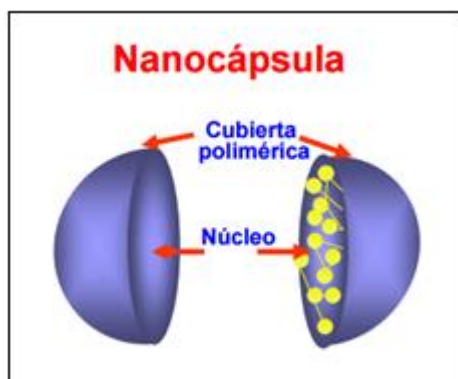
A pesar del potencial de los alimentos funcionales y en específico del resveratrol para enriquecerlos, su baja solubilidad en agua, su inestabilidad química y su baja bioadisponibilidad comprometen su uso en la industria alimentaria. La encapsulación es una técnica prometedora para eliminar dichas barreras y crear alimentos funcionales con alto contenido en resveratrol.

### 1.3 La encapsulación en la industria alimentaria

En la actualidad existen numerosos ingredientes encapsulados: agentes saborizantes, ácidos, bases, edulcorantes artificiales, colorantes, conservadores, agentes leudantes, aromas y vitaminas, entre otros. Se pueden encontrar diferentes métodos para la encapsulación y, la selección del mismo, estará en función de los costos, de las propiedades del material a encapsular, del tamaño deseado de las cápsulas, la aplicación y de los mecanismos de liberación (Pedroza, 2002).

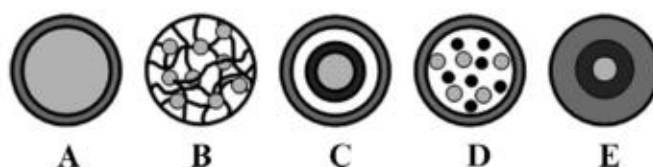
La encapsulación se puede definir como la técnica en la cual uno o más ingredientes están atrapados dentro de una matriz. Esta matriz puede ser sólida o líquida, homogénea o heterogénea, y microscópica o macroscópica. Se denomina núcleo o material activo al compuesto que va a ser encapsulado, y pared, cubierta o encapsulante, al material que

forma la matriz (figura 11). Las partículas con diámetros de alrededor de 1 a 1000 nm pueden ser referidos como microcápsulas, mientras que aquellos con diámetros de alrededor de 10 a 1000 nm se conocen como nanocápsulas (Davidov-Pardo, 2014).



**Figura 11.** Estructura de una nanocápsula (Irache, 2010).

La encapsulación es un sistema que se utiliza para estabilizar compuestos bioactivos inestables, ofrece la protección adecuada contra las interacciones no deseadas con el medio y otros componentes, y controla la liberación del compuesto bioactivo en el tejido diana en el cuerpo (Augustin, 2013). Existen distintos modos de diseñar formulaciones para crear sistemas de encapsulación basados en el empleo de tensoactivos, lípidos, biopolímeros, o mezclas de estos componentes. Los sistemas de entrega diseñados incluyen micelas simples o mixtas estabilizadas por agentes tensoactivos, núcleos bioactivos individuales en partículas o en una cubierta polimérica (hidrogel o coacervados), complejos bioactivo-biopolímeros solubles, o varios núcleos y sistemas multicapa estructurados (Figura 12).



**Figura 12.** Representación de la morfología de los diferentes tipos de capsulas. (A) Cápsula de un solo núcleo, (B) núcleo en gel de polímero, (C) cápsula de múltiples capas, (D) cápsula de doble núcleo, (E) cápsula de un núcleo y múltiples cubiertas (Augustin, 2013)



En la aplicación a los alimentos, se deben de considerar un número de factores adicionales para el diseño efectivo de encapsulación. Existe un amplio número de sistemas que pueden utilizarse para liberar componentes en los alimentos funcionales. Para esta finalidad es necesario tener en cuenta algunas consideraciones como la eficiencia de entrega, el mecanismo de entrega, la protección que presenta contra la degradación química, compatibilidad de la matriz alimentaria, bioactividad, etc. (McClements, 2009).

Las nanopartículas formuladas a partir de polímeros naturales se han utilizado como sistemas acarreadores por las siguientes razones (Esquivel, 2013; Ronquillo, 2009; Escalona, 2004; Parra Huertas, 2010; Irache, 2010):

1. Controla la manipulación de los compuestos activos.
2. Incrementa la estabilidad y aumenta la vida media del producto al ofrecer protección frente al calor, humedad, aire, luz, oxígeno y otros factores ambientales.
3. Retiene los ingredientes volátiles.
4. Enmascara o preserva sabores indeseados.
5. Proporciona seguridad contra las pérdidas nutricionales.
6. Estabiliza el material del núcleo.
7. Mejora la biodisponibilidad de aquellos compuestos bioactivos que presentan características pobres de absorción.
8. Prolonga el tiempo de residencia de los bioactivos en el intestino.
9. Controla la liberación de los compuestos con actividad biológica.
10. Dirige la liberación del bioactivo a un órgano en específico y reducen su toxicidad.
11. Reduce la irritación de la mucosa intestinal producida por el compuesto bioactivo.
12. Asegura la estabilidad del bioactivo en el tracto gastrointestinal.

En el desarrollo de los sistemas de entrega es necesario considerar la aplicación final, las limitaciones y beneficios que puede ofrecer la encapsulación sobre el bioactivo deseado. Los materiales de pared juegan un papel fundamental en alcanzar el objetivo deseado.

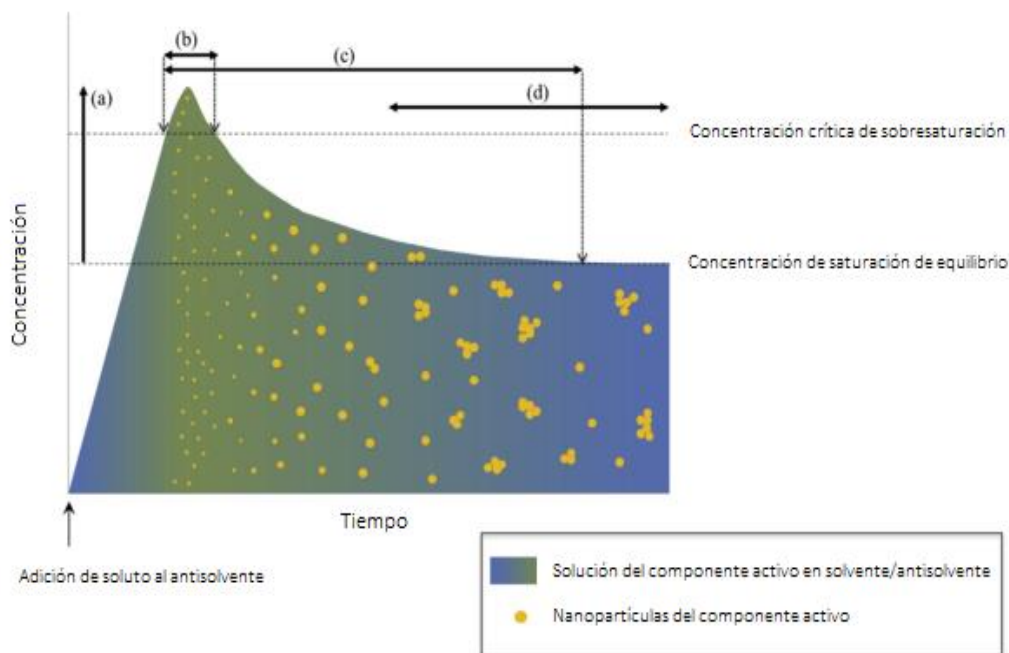
### 1.3.1 Método de precipitación anti-solvente

En la producción de nanopartículas existen diferentes métodos. Puede realizarse a través de un método descendente en el que se produce el desglose de las partículas más grandes en nanopartículas o, mediante un método ascendente, en el cual se obtienen nanopartículas mediante el ensamblaje de moléculas o partículas más pequeñas (Joye, 2013). Entre las diversas técnicas de producción de nanopartículas, el proceso de precipitación antisolvente es una técnica eficaz para producir partículas nanométricas. Este es un método que no implica la utilización de un equipo especializado, y el riesgo de contaminación de las muestras es relativamente inferior con respecto a la metodología descendente (Joye, 2013). Esta técnica se ha utilizado en la formación de nanopartículas que emplean zeína y gliadina para encapsular compuestos funcionales lipófilos (Davidov-Pardo, 2015).

El método de precipitación antisolvente consiste en la introducción de la solución orgánica que contiene el ingrediente activo al antisolvente, mediante un mezclado rápido que genera una sobresaturación que conduce a la nucleación (Kim, 2012). Se trata de un proceso instantáneo que ocurre por una rápida desolvatación del ingrediente activo en el medio antisolvente (Ruch, 2000). La adición del antisolvente reduce la calidad del disolvente, que favorece las interacciones biopolímero-biopolímero sobre las interacciones biopolímero-solvente, promoviendo la asociación de las moléculas de biopolímero (Li, 2015; Joye, 2015).

La velocidad de adición, el orden en el método, la proporción de solvente/antisolvente, la temperatura o la selección del antisolvente son algunos de los parámetros que influyen en este método de producción de nanopartículas (Joye, 2013). Investigaciones de otros autores (Zhao, 2007), encontraron una relación inversa entre las proporciones del antisolvente y el solvente y el tamaño de la partícula.

Es posible la diferenciación de varias etapas de producción en el proceso de precipitación antisolvente: sobresaturación, nucleación, crecimiento de cristales y coagulación (Joye, 2013) (figura 13).



**Figura 13.** Representación de las etapas del método de precipitación antisolvente. Sobresaturación (a), nucleación (b), crecimiento por condensación (c), y por coagulación (d) (Joye, 2013).

En primer lugar, la adición de soluto en el antisolvente o viceversa, disminuye el poder del solvente y conduce a la sobresaturación. Cuando la concentración de soluto excede la concentración de saturación del equilibrio, asociado con la mezcla del solvente y antisolvente, el sistema se vuelve sobresaturado (a) y cuando supera la concentración crítica de sobresaturación, comienza la etapa de nucleación (b). El tiempo transcurrido entre el inicio de la sobresaturación y la aparición de los núcleos es denominado tiempo de inducción. Esta etapa condiciona las propiedades de las nanopartículas como el tamaño, la cristalinidad, la morfología y la pureza.

Cuando se produce el cese de la adición, la concentración de soluto puro comienza a disminuir y pasa la concentración de sobresaturación crítica y la energía de barrera por segunda vez. En este momento, la etapa de la nucleación termina y los núcleos formados siguen creciendo por condensación (c) y coagulación (b).

La figura 13 (d) representa la etapa de coagulación, que se produce cuando dos o más partículas se adhieren entre sí. Esta coagulación de las partículas tiende a producirse cuando las interacciones de atracción como van der Waals o atracción hidrófoba dominan a las interacciones repulsivas (repulsión electrostática o estérica) (Joye, 2013).

Algunos estudios indicaron que, el tamaño de partícula disminuye cuando el pH se encontraba cerca del punto isoeléctrico en la producción de nanopartículas de zeína (Podaralla, 2012).

### 1.3.2 Materiales de pared

En la encapsulación de un ingrediente alimentario es fundamental la elección de los materiales de pared. Las normas para los aditivos alimentarios son más rígidas que para productos farmacéuticos (Esquivel, 2013). Distintos compuestos aprobados para la encapsulación de fármacos, no han sido aprobados para su uso en la industria alimentaria, ya que muchas de estas sustancias no han sido certificadas para sus aplicaciones en alimentos como materiales “generalmente reconocidos como seguros” (GRAS) por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos). Todo el procesamiento de alimentos debe diseñarse con el fin de cumplir con los requisitos de seguridad de las agencias gubernamentales como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) o FDA en EE.UU (Aldana, 2004).

Las sustancias de revestimiento son aquellas que forman películas y se pueden seleccionar de entre una amplia variedad de polímeros naturales o sintéticos, en función del material y de las características finales deseadas en las nanopartículas. Un material de revestimiento ideal debe poseer las siguientes características (Aldana, 2004):

- Buenas propiedades reológicas a altas concentraciones y facilidad de manipulación durante el método de encapsulación.
- Ser inerte con el material a encapsular durante el procesamiento y almacenamiento prolongado.
- Capacidad de sellar y mantener el material activo dentro de su estructura durante el procesamiento o almacenamiento.
- Capacidad de proporcionar la máxima protección a la materia activa contra las condiciones ambientales (calor, luz, humedad, pH y otros ingredientes reactivos).
- Solubilidad en disolventes aceptables en la industria alimentaria o en el producto alimentario final.
- Capacidad para cumplir con las propiedades de solubilidad especificadas o deseadas de las nanopartículas y las propiedades de liberación del activo.

- Poseer bajo costo.

En la práctica se suele emplear una combinación de materiales de revestimiento. Algunos de los que se utilizan se muestran en la tabla 2 (Shahidi, 1993).

**Tabla 2.** Materiales de pared más empleados en la encapsulación de alimentos (Aldana, 2004).

Clases de material	Tipos específicos de recubrimientos
<b>Gomas</b>	Goma arábica, goma tragacanto, goma acacia, goma karaya, goma de mezquite, alginato de sodio, carragenina
<b>Carbohidratos</b>	Almidón y sus derivados, maltodextrinas, sacarosa, jarabe de maíz, ciclodextrinas
<b>Celulosas</b>	Carboximetil celulosa, metil celulosa, etil celulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa, acetato de celulosa-ftalato, celulosa acetato-butirato-ftalato
<b>Lípidos</b>	Cera, parafina, triestearina, ácido esteárico, monoglicéridos, diglicéridos, cera de abeja, cera de carnauba, cera candelina, aceites, grasas, glicéridos y fosfolípidos
<b>Materiales inorgánicos</b>	Sulfato de calcio, Silicato
<b>Proteínas</b>	Gluteína, caseína, gelatina, albúmina, hemoglobina, péptidos

La mayoría de los materiales utilizados en la encapsulación en el sector alimentario son biomoléculas. Dado que la mayoría de los materiales son de naturaleza hidrófila, los sistemas de liberación están diseñados basándose en las interacciones proteína-polisacárido, molécula bioactiva-biopolímero, autoensamblaje, diferencias de solubilidad dependientes del pH, entrecruzamiento y modificaciones hidrófobas (Esquivel, 2013). En el caso de biopolímeros hidrófobos como la zeína, una precipitación anti-disolvente puede utilizarse de forma eficiente para producir partículas coloidales mono-dispersas (Patel, 2010). Los sistemas particulados se están volviendo cada vez más importantes para la encapsulación, la protección y la liberación de ingredientes funcionales, como fármacos, nutracéuticos, sabores y antimicrobianos.

### 1.3.3 Zeína

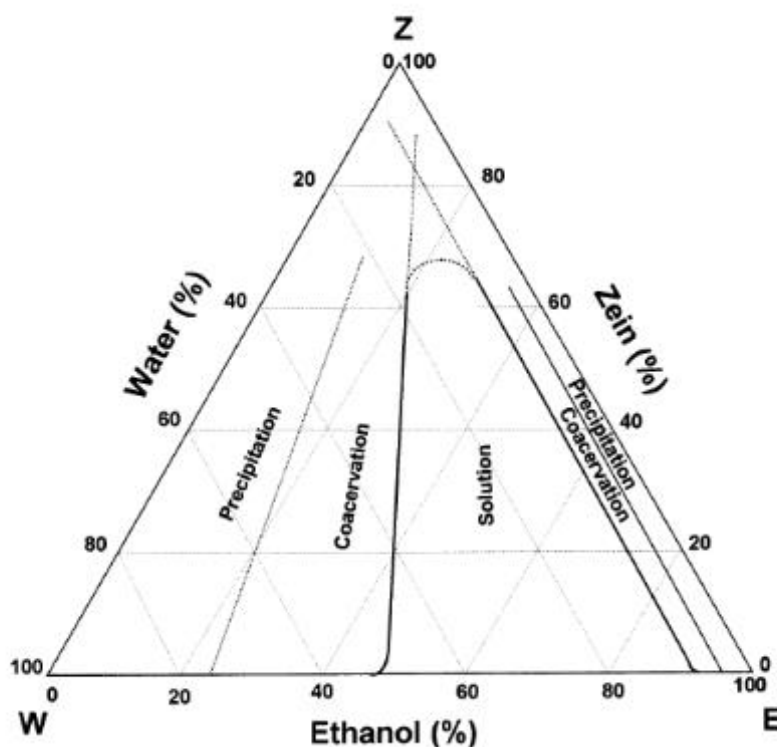
La zeína es la proteína de reserva mayoritaria del grano de maíz y comprende del 40-50 % de la proteína total. Se identificó por primera vez en 1897 debido a la solubilidad en soluciones etanólicas (60-95 %). El comportamiento de su solubilidad está determinado por su alta proporción de aminoácidos con residuos no polares, como son leucina (20 %), prolina (10 %) y alanina (10 %) y su deficiencia en aminoácidos básicos o ácidos (tabla 3).

**Tabla 3.** Composición de aminoácidos de la zeína (Esquivel, 2013).

Clasificación	Aminoácido	Zeína nativa Mossé (1961)	Zeína comercial Pomes (1971)
<b>No polar</b>	Glicina	0	0,7
	Alanina	10,5	8,3
	Valina	3,9	3,1
	Leucina	21,1	19,3
	Isoleucina	5,0	6,2
	Fenilalanina	7,3	6,8
	Triptófano	0,2	-
	Prolina	10,5	9,0
	Serina	7,1	5,7
<b>-OH</b>	Treonina	3,4	2,7
	Tirosina	5,2	5,1
<b>-S</b>	Metionina	2,4	2,0
	Cisteína	0,8	0,8
<b>Básico</b>	Lisina	0,0	-
	Arginina	4,7	1,8
	Histidina	1,3	1,1
	Asparagina	-	4,5
	Glutamina	-	21,4
<b>Ácido</b>	Ácido aspártico	4,6	-
	Ácido glutámico	26,9	1,5

El primer paso para la manufactura de la zeína es la extracción de la proteína mediante el uso de los solventes adecuados. Tomando en consideración la proporción de aminoácidos no polares en la zeína, es posible predecir que el tipo de solventes empleados para la solubilización y la extracción de la proteína deben contener grupos tanto polares como apolares. Las soluciones acuosas de etanol han sido empleadas ampliamente para la producción comercial de zeína, mostrando una buena solubilidad de la proteína en soluciones del 50-90 % de etanol (Zhong, 2009).

El comportamiento de la solubilidad se muestra en el diagrama de fases (figura 14). A temperatura constante, la solubilidad de la zeína varía entre 2 y 6 % (w/w) dependiendo de la concentración de etanol. A bajas (< 40%) y altas (> 90%) concentraciones de etanol se presentan dos fases, las cuales contienen agua, zeína y etanol. La formación de precipitado a bajas concentraciones de etanol se puede evitar a bajas temperaturas, por la remoción de pigmentos y otros compuestos solubles en éter, y la reducción de puentes disulfuro.



**Figura 14.** Diagrama de tres fases para la solubilidad de la zeína en etanol y agua (Shukla, 2001).

El uso de la zeína en muchas de sus aplicaciones potenciales se ha visto obstaculizado por su coloración amarilla (Parris, 2005). Esto es debido a pigmentos del maíz como son las xantofilas, carotenoides y otros compuestos, asociados con las proteínas hidrófobas

(Esquivel, 2013). Estos pigmentos tienden a transferir su color a las superficies que recubren, lo que es indeseable en algunas aplicaciones, por lo que se han buscado alternativas para producir zeína libre de color, mediante el empleo de solventes como el tolueno, éter de petróleo, benzol, etanol o propanol. Sin embargo, éstos no penetran en la matriz de la zeína lo suficiente como para remover todas las impurezas. Además, son necesarios volúmenes muy grandes y no son de grado alimentario lo que limita el uso de la proteína blanqueada para las aplicaciones tanto alimentarias como farmacéuticas (Shukla, 2001).

La zeína presenta unas propiedades adecuadas para su utilización como recubrimientos duros, brillantes, impermeables, flexibles y compresibles (tabla 4). La zeína ha sido aplicada para la formación de películas, recubrimientos y cápsulas para el atrapamiento y la liberación controlada de fármacos, aceites esenciales o micronutrientes en el área alimentaria y farmacéutica (Parris, 2005; Luo et al., 2010; Luo et al., 2011; (Luo et al., 2012; Luo et al., 2013; Esquivel, 2013; (Arcan, 201; (Hurtado-López, 2006; Patel, 2010; Zou, 2012).

**Tabla 4.** Propiedades de la zeína (Shukla, 2001).

Propiedad	Características
<b>Color</b>	Crema
<b>Constante dieléctrica, a 500 V, 60 ciclos, 25-90 °C</b>	4,9 – 5,0
<b>Coefficiente de difusión</b>	$3,7 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$
<b>Coefficiente de viscosidad</b>	25
<b>Temperatura de transición vítrea</b>	165 °C
<b>Punto isoeléctrico, pH</b>	6,2 (varía entre 5 y 9)
<b>Peso molecular</b>	35000 (varía entre 9,6 y 44 K)
<b>Forma física</b>	Polvo amorfo
<b>Coefficiente de sedimentación</b>	1,5 s
<b>Gravedad específica, a 25 °C</b>	1,25
<b>Punto de degradación térmica</b>	320 °C

En los estudios de Parris, (2005) propusieron la encapsulación de aceites esenciales en nanoesferas a base de zeína como un vehículo de encapsulación con liberación específica para maximizar las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales. Estas



nanoesferas presentaron la característica de poseer una posible aplicación oral o inyectable de materiales biológicos, debido a que presentan una rápida liberación en el intestino grueso.

En estudios previos, se ha evaluado la encapsulación del resveratrol en partículas de biopolímeros para favorecer la estabilidad del componente activo. La producción de nanopartículas de zeína mediante el método de precipitación antisolvente supone un sistema prometedor para el enriquecimiento de alimentos funcionales (Davidov-Pardo, 2015).

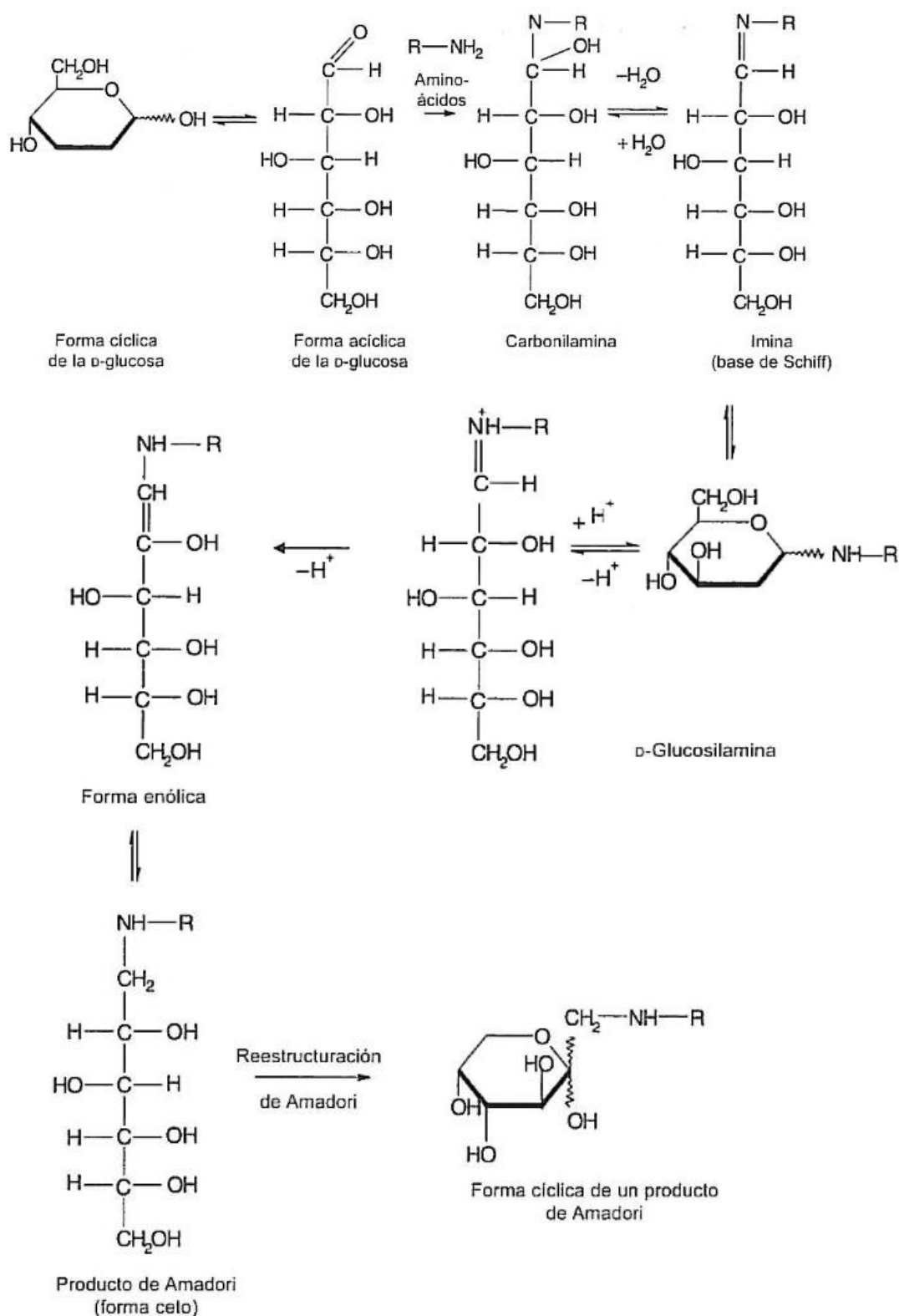
## 1.4 La reacción de Maillard

La reacción de Maillard o pardeamiento no enzimático se produce como consecuencia de la caramelización de los azúcares, de la reacción entre quinonas con grupos amino o aminoácidos y de la interacción entre productos de la oxidación lipídica con proteínas. Los azúcares más destacados en el proceso de Maillard son la glucosa y la fructosa.

### 1.4.1 Etapas de la reacción de Maillard

La reacción de Maillard consta de tres etapas:

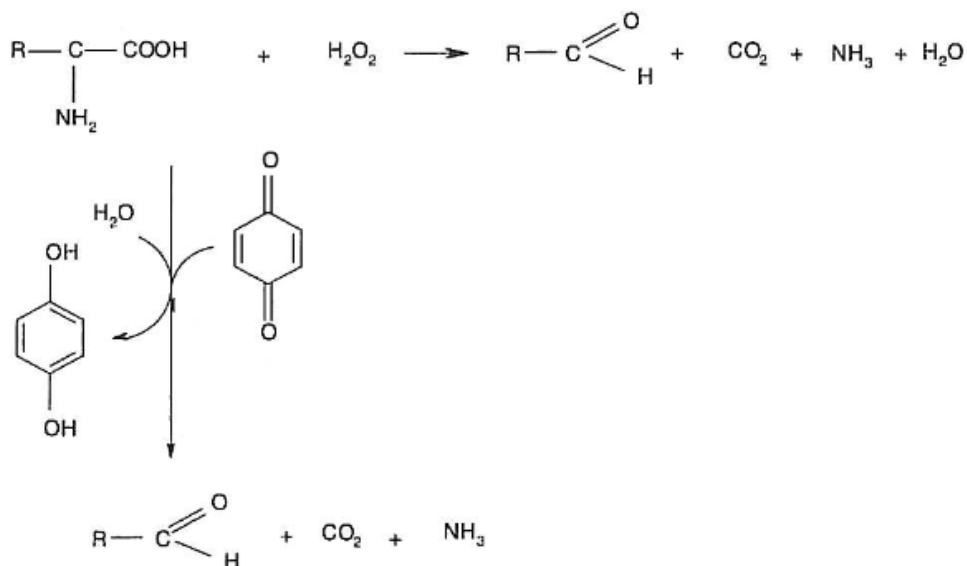
- a) **Etapas inicial.** La primera etapa corresponde a una serie de reacciones químicas en las que aún no se produce el pardeamiento. Comienza con la condensación entre el grupo carbonilo del azúcar reductor y el grupo amino de un aminoácido, péptido o proteína dando lugar a la base de Schiff que sufre una reorganización denominada de Amadori (figura 15).



**Figura 15.** Formación de glicosamina y reestructuración de Amadori (Damodaran, 2008).

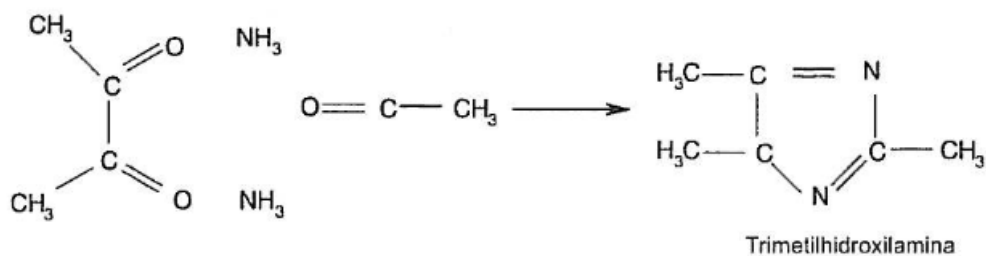
- b) **Etapa avanzada.** En esta etapa se produce la fragmentación de los azúcares y la degradación de los aminoácidos, formándose los compuestos coloreados. El factor

que influye en el desarrollo de la reacción es el pH. La deshidratación produce reductonas y dihidroreductonas que pueden reaccionar con aminoácidos que sufren la degradación de Strecker (figura 16) dando lugar a piracinas y aldehídos. El compuesto de Amadori puede degradarse mediante reacciones de enolización (Ruiz, 2009).



**Figura 16.** Degradación de Strecker (Damodaran, 2008).

- c) **Etapa final.** Esta etapa envuelve una serie de reacciones que originan oligómeros y polímeros insolubles de elevado peso molecular (figura 17). Se trata de pigmentos pardos llamados melanoidinas, difíciles de aislar y cuya estructura y caracterización son objeto de estudio. Estas macromoléculas pueden diferir en la estructura en función de las condiciones en las que haya transcurrido la reacción (Ruiz, 2009).



**Figura 17.** Formación de compuestos aromáticos heterocíclicos (Damodaran, 2008).

#### 1.4.2 Influencia de las condiciones de reacción

De los factores que influyen en la reacción sobre la reacción de Maillard, la temperatura influye tanto en la tasa de reacción como en los mecanismos involucrados en la misma. La energía de activación varía entre 10 y 160 kJ/mol y depende en gran medida del contenido en agua del alimento. El desarrollo del pardeamiento se incrementa con la temperatura alcanzando valores máximos con actividades de agua de 0,3-0,7. La reacción es muy lenta cuando el contenido en agua es muy bajo y se acelera según se incrementa éste. Sin embargo, si el contenido en agua es elevado, a tasa de reacción disminuye debido al efecto de dilución de los reactivos. La tasa de reacción también se incrementa según se eleva el pH del medio, alcanzándose la máxima tasa de reacción a pHs ligeramente alcalinos. El desarrollo de la reacción de pardeamiento se inhibe en presencia de dióxido de azufre, sulfitos y otros compuestos azufrados debido a que los sulfitos reaccionan con los grupos aldehídos, cetonas o los azúcares, disminuyendo su reactividad (Damodaran, 2008).

#### 1.4.3 Formación de conjugados de Maillard

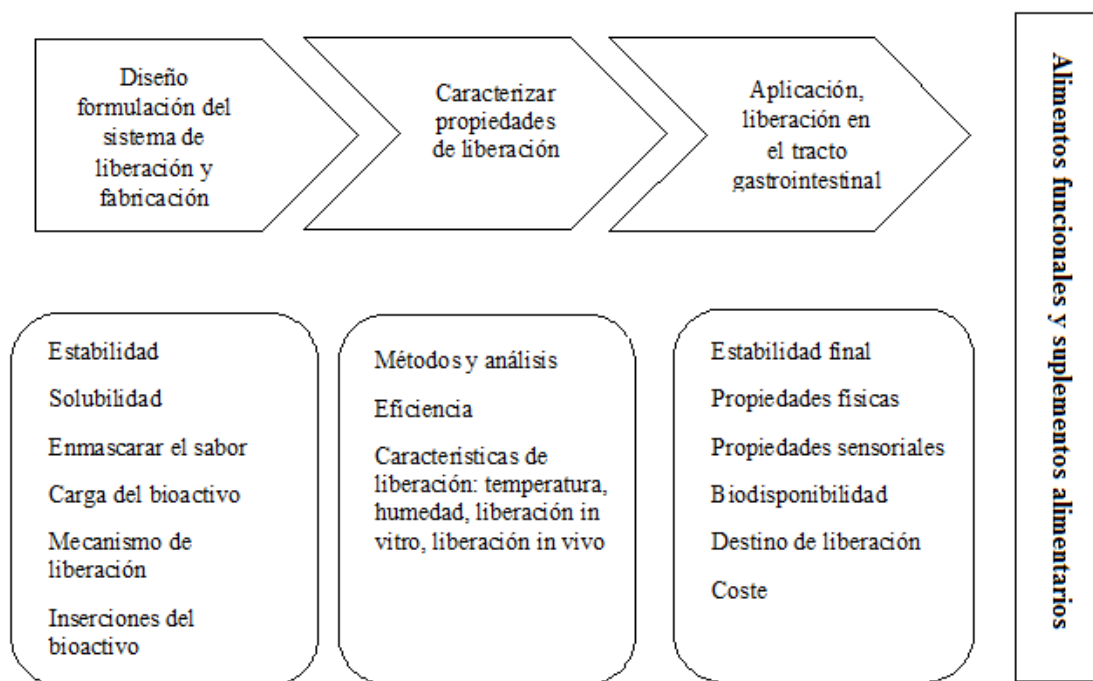
Se han realizado estudios en los cuales se proponen los conjugados de polisacárido-proteína como agentes de encapsulación. En la investigación de Markman (2011), se estudiaron los conjugados formados por caseína-maltodextrina con nutraceuticos hidrofóbicos para crear nanovehículos para favorecer el enriquecimiento de bebidas claras. En este caso, la vitamina D quedó atrapada por los conjugados y se realizó una comparativa con los controles de la mezcla no conjugada y vitamina D no encapsulada.

Con los conjugados se presentaron varias ventajas, los diámetros de los conjugados-vitamina D eran más pequeños y la solución más transparente respecto a los controles. Este sistema de conjugados confiere mejor protección frente a la oxidación, contra la degradación a pH bajo y durante la vida útil. En la simulación de las condiciones de la digestión gástrica, el modelo para bioactivos hidrófobos no fue liberado de los nanovehículos, lo que sugiere un potencial como recubrimiento entérico para la entrega de bioactivos en el intestino. Además, concluyeron que, esta tecnología puede utilizarse para el enriquecimiento de bebidas claras para mejorar la salud (Markman, 2011).

El estudio de Lesmes (2012), se centraba en la utilización de conjugados de Maillard proteína-carbohidrato como emulsionantes para modular la estabilidad física y química de las emulsiones (O/W) en el tracto gastrointestinal. Otros estudios previos mostraron que, emulsionantes basados en estos conjugados son altamente efectivos para controlar la funcionalidad de la emulsión. Se obtuvieron conjugados de Maillard  $\beta$ -lactoglobulina-dextrano que fueron utilizados para estabilizar el aceite de maíz en emulsiones de agua. Este sistema formado por calentamiento seco, mostraron ser mejores emulsionantes, aumentaron la resistencia al estrés ambiental como el pH, fuerza iónica, y temperatura. Se necesita más investigación para adaptar el rendimiento de la emulsión en el tracto gastrointestinal humano. De tal forma, los conjugados adaptados pueden ser útiles para mejorar la estabilidad de la emulsión, el control de la digestión de las grasas y la entrega de ingredientes lipófilos en el colon (Lesmes, 2012). Durante este estudio se examinó la estabilidad de los conjugados durante la simulación de las condiciones gastrointestinales, de tal forma que la nanoencapsulación pueda suponer una vía para la mejora de la biodisponibilidad.

### 1.5 Digestión *in vitro*

A través de la encapsulación, es posible aumentar la solubilidad en agua de los compuestos encapsulados y por lo tanto, también mejorar su biodisponibilidad. En el esquema de la figura 18 se representa el proceso general para aumentar la estabilidad y la biodisponibilidad de un compuesto activo.



**Figura 18.** Enfoque generalizado para el diseño de formulaciones y procesos para la estabilización y mejora de la biodisponibilidad de un compuesto bioactivo (Augustin, 2013).

Los métodos *in vitro* basados en la simulación de los procesos de digestión, se utilizan ampliamente para el estudio del comportamiento gastro-intestinal de los alimentos o productos farmacéuticos. Estos métodos tratan de imitar las condiciones fisiológicas *in vivo*, teniendo en cuenta la presencia de enzimas digestivas y sus concentraciones, pH, tiempo de digestión y concentraciones de sal, entre otros factores.

Los modelos estáticos de la digestión humana se han utilizado para tratar diversas cuestiones como la digestibilidad, bioaccesibilidad (cantidad de un compuesto que se libera de la matriz y que se considera que está disponible para la absorción a través de la pared intestinal) de productos farmacéuticos, micotoxinas, y macronutrientes como proteínas, carbohidratos y lípidos. También se utiliza para el estudio de la liberación de micronutrientes como minerales y oligoelementos, y sustancias vegetales incluyendo carotenoides y polifenoles (Tavares, 2013), (Bouayed, 2011).

### 1.5.1 Parámetros de la digestión *in vitro*

Los parámetros que afectan al sistema de digestión simulado varían en función de la etapa:

- Fase gástrica

El propósito básico del estómago es la entrega gradual de comida al intestino delgado de una manera regulada para optimizar la digestión intestinal. En la parte inferior del estómago, la comida se mezcla y se digiere con enzimas secretadas y ácido clorhídrico, y se vacía poco a poco en el duodeno.

*Duración del paso gástrico.* El vaciado gástrico de una comida sólida, se efectúa normalmente, entre 3 y 4 horas. Vaciado de 300 ml de agua requiere una hora, mientras que hay estudios que indican que, los líquidos con una concentración baja en proteínas necesitan menos tiempo.

*Volumen de las secreciones gástricas.* El volumen total de la secreción gástrica depende del estado de ayuno y la consistencia de la comida. Una comida líquida suele requerir de medio a un volumen de secreción gástrica para la digestión, por otro lado, para una comida sólida se secretan dos volúmenes de jugos gástricos.

*pH.* Después de la ingesta de alimentos, generalmente el pH aumenta a 5 incluso con valores superiores. La secreción del ácido clorhídrico baja el pH a los valores requeridos para la actividad óptima de las enzimas y en consecuencia el pH vuelve al ayunado que se encuentra por debajo de 2.

Se requieren condiciones ligeramente ácidas con pH entre 4 y 6 para la actividad óptima de la lipasa gástrica, mientras que la pepsina será activa entre pH 2 y 4. Se recomienda el uso de un valor estático (pH 3) para la simulación de los fluidos gástricos.

*Actividad de la pepsina.* La pepsina es la única enzima proteolítica en el estómago. El contenido de la enzima varía con los individuos, sin embargo, aumenta en la digestión de 0,26 (30 min) a 0,58 mg/mL (180 min). El estudio de Minekus (2014) realiza una evaluación de la literatura y propone la utilización de pepsina porcina como equivalente.

*Actividad de la lipasa gástrica.* La actividad de la lipasa gástrica es inferior (12-120 U/ml) en comparación a la del tracto de duodeno (80-7000 U/mL). La lipólisis gástrica es solo

parcial (5-40 %) debido a la cantidad presente y al pH. En ausencia de triacilglicerol o cuando la digestión de proteínas y polisacáridos es el foco principal del estudio, la adición de lipasa puede omitirse.

*Las sales biliares.* Se encuentran bajas concentraciones de ácidos biliares (0,2 mM) en el fluido gástrico humano en ayunas.

*Los fosfolípidos.* Las bajas concentraciones de fosfolípidos se encuentran en el compartimento gástrico y se ha demostrado que afectan a la tasa de digestión de la proteína en los entornos gástricos e intestinales. En ausencia de fosfolípidos u otros tensioactivos de bajo peso molecular presentes en el alimento, se puede recomendar 0,17 mM en la solución gástrica final (Minekus, 2014).

- Fase intestinal

Una vez que los alimentos han circulado por la fase gástrica simulada, se transfiere a una simulación de la digestión que se produce en el intestino delgado. Existen muchas variables que pueden influir en el tiempo de tránsito por el intestino, sin embargo, se sugiere que el tiempo estimado es de dos horas. El pH duodenal aumenta a alrededor de 7,5 en el íleon distal, por este motivo en la simulación del fluido intestinal es recomendable un valor medio de pH (7,0). Los componentes más importantes son los enzimas pancreáticos y la bilis. En el caso de las enzimas se recomienda el uso de pancreatina porcina y de la bilis, el uso de cualquiera de extracto de bilis o bilis porcina congelada.

*Extractos biliares.* Es importante para el transporte de los productos de la lipólisis. La concentración final en el líquido total es de 10 mM (Kalantzi, 2006).

*Pancreatina.* La pancreatina porcina contiene las enzimas pancreáticas importantes en diferentes cantidades. La cantidad de pancreatina se basa en los ensayos de tripsina. Es necesaria la determinación de la actividad proteolítica, lipolítica y amilolítica de la pancreatina. Hay que considerar que, la pancreatina contiene cantidades de diferentes sales y se tiene que tener en cuenta en la adición del calcio al SIF. En los alimentos altos en grasa hay que valorar que la concentración de lipasa y amilasa de la pancreatina pueden ser diferentes a los recomendados. La alternativa a la utilización de la pancreatina es el uso de enzimas individuales (Minekus, 2014).



## 1.6 Nanoencapsulación del resveratrol

Trabajos recientes se están dedicando a la investigación en la utilización de micro/nanopartículas con el fin de proporcionar una liberación controlada del resveratrol. La encapsulación puede proteger al resveratrol de las condiciones ambientales que favorecen su degradación química durante el almacenamiento, como la luz ultravioleta o el oxígeno. Además, mejora la biodisponibilidad del resveratrol mediante el aumento de su solubilidad en los fluidos gastrointestinales, promoviendo su absorción, y reduciendo su metabolismo antes de la absorción (Davidov-Pardo, 2014).

Se han realizado estudios sobre la encapsulación del resveratrol como la utilización de partículas de biopolímeros (Davidov-Pardo, 2015), la encapsulación del resveratrol en  $\beta$ -glucanos para la aplicación a productos nutraceuticos (Galán, 2013) la complejación del resveratrol con diferentes tipos de ciclodextrinas (Lucas Abellán, 2007). La explotación del resveratrol como alimento funcional o ingrediente nutraceutico es factible solamente cuando se encapsula en un sistema de entrega, que es el mecanismo para proteger y estabilizar de la degradación, preservando sus actividades biológicas y la mejora de la biodisponibilidad (Sessa, 2011).

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Considerando los beneficios que el resveratrol puede aportar en el desarrollo de alimentos funcionales, el objetivo general que se plantea en el presente estudio consiste en mejorar la estabilidad y la bioaccesibilidad del resveratrol mediante la utilización de nanopartículas y complejos biopoliméricos.

### 2.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos para la consecución del objetivo general se indican a continuación:

- Evaluar la conjugación proteína-polisacárido del caseinato y dextrano de 37 kDa mediante la reacción de Maillard.
- Determinar el impacto de la encapsulación en nanopartículas de zeína elaboradas por precipitación antisolvente en la estabilidad y bioaccesibilidad *in vitro* del resveratrol.
- Determinar el impacto de la encapsulación de resveratrol en complejos elaborados con caseinato en la solubilidad, estabilidad y bioaccesibilidad *in vitro* del resveratrol.
- Evaluar el impacto del uso de conjugados de Maillard en la solubilidad, estabilidad y bioaccesibilidad *in vitro* del resveratrol encapsulado en nanopartículas biopoliméricas de zeína y en complejos con caseinato.

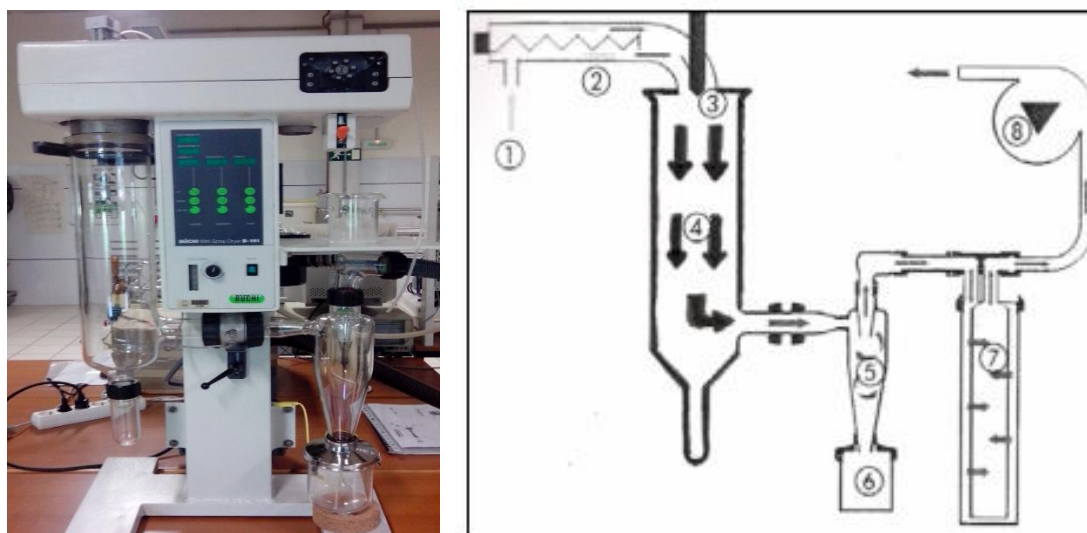
### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Materiales

Resveratrol standard (pureza  $\geq 99$  %) fue adquirido de Extrasynthese (Lyon, Francia). Dodecilsulfato sódico (SDS), orto-ftaldehído (OPA  $\geq 90$  %), leucina, y 2 mercaptoetanol se adquirieron de Merk (Madrid, España). Dextrano (40 kDa), pepsina, pancreatina y extracto de bilis se adquirieron de Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España). Etanol 96 % fue adquirido de OPPAC (Navarra, España). Tetraborato sódico de grado analítico fue adquirido de Probus (Barcelona, España), la lecitina de soja se adquirió de Guinama (Valencia, España). Carbonato de amonio de grado analítico fue adquirido de Alfa Aesar (Ward Hill MA, USA). Todos los demás productos químicos, reactivos y disolventes fueron adquiridos de Panreac (Barcelona, España). Resveratrol (99 %) a partir del extracto de piel de uva se adquirió de Changsha Organic Herb Inc. (Changsha, China). Zeína de grado alimentario fue adquirido de Kobayashi Co. (Tokyo, Japón). El caseinato de sodio fue adquirido de VicorQuimia (Barcelona, España).

#### 3.2 Proceso de conjugación por la reacción de Maillard

Una mezcla de caseinato de sodio y dextrano de 37 kDa 1:1,75 (w/w) fueron solubilizadas durante la noche en agua para alcanzar una concentración final de 2,75 % (w/w). Se hizo pasar la mezcla por el Mini Spray Dryer B-191 de Büchi (figura 19) con unas condiciones de: 150 °C de temperatura de entrada a 7,5 ml/min, presión de aire comprimido de 600 kPa y una velocidad de flujo de 35 m<sup>3</sup>/h (Shah, Davinson, Zhong, 2012). La formación de conjugados se realizó en seco a 76% de humedad relativa y 60 °C (Markman y Livney, 2011; Pan, Mu, Hu, Yao y Jiang, 2006) durante 48 h tomando muestras cada 8 h.



**Figura 19.** Mini Spray Dryer B-191 de Büchi y a la derecha el esquema de los componentes del equipo. Boca de aspiración (1), calefacción eléctrica (2), boquilla de atomización (3), cilindro de pulverización (4), ciclón (5), recolector (6), filtro de salida (7), aspirador (8).

### 3.3 Estimación de la extensión de la conjugación

Para determinar la extensión de la conjugación se realizó la prueba de orto-ftaldehído (OPA), y las mediciones de la turbidez y del pardeamiento.

#### 3.3.1 Prueba de orto-ftaldehído (OPA)

Las muestras conjugadas se analizan por la prueba OPA para determinar el grado de conjugación mediante la cuantificación de los grupos amino libres en la proteína tras la reacción de Maillard. La metodología de la prueba se basa en el estudio de Pan, Mu, Hu, Yao y Jiang (2006): Los conjugados se disolvieron en agua tipo I (5 mg/ml) y se ajustaron a pH 7. El reactivo OPA se preparó mezclando 80 mg de orto-ftaldehído disuelto en 2 ml 95 % etanol, 50 ml 0,1 M solución tampón de tetraborato de sodio a pH 9,5; 5 ml 20 % SDS; 0,2 ml 2-mercaptoetanol; 0,1 ml L-leucina (muestra) 0,1 M; la mezcla luego se diluyó con DDW a 100 ml. Posteriormente, 0,1 ml de la solución de conjugados se mezcló con 2,7 ml del reactivo OPA y tras 1 min, se mide la absorbancia a 340 nm (Thermo Scientific Multiskan GO spectrophotometer, ThermoFisher Scientific, Varta, Finlandia).

### 3.3.2 Turbidez

Este método se realizó para comprobar la formación de conjugados y establecer el momento de estabilización. Se determinó la turbidez al punto isoeléctrico de la proteína (4,6) a través de dos procedimientos. En primer lugar, la turbidez se determinó mediante la medición de la absorbancia a 600 nm y por otro lado, con un turbidímetro (Turbiquant 3000 IR, Merck, Darmstadt, Alemania). Las muestras se disolvieron en agua a una concentración de 5 mg/ml y se ajustó el pH a 4,6.

### 3.3.3 Pardeamiento

La medición de la absorbancia a 420 nm indica el pardeamiento que se produce a consecuencia de la reacción de Maillard. Las muestras en una concentración de 5 mg/ml se disolvieron en agua y se prepararon diluciones 1:5, posteriormente se realizó la medición de la absorbancia.

## 3.4 Cuantificación de resveratrol

El contenido de resveratrol de las nanopartículas se cuantificó mediante la absorbancia a 307 nm. El resveratrol puro fue disuelto en DMSO a 100 mg/ml y después se diluyó para crear la curva de calibración.

## 3.5 Solubilidad del resveratrol

Para determinar la solubilidad del resveratrol se prepararon diluciones de diferentes concentraciones de resveratrol (25-1500 µg/ml) en la solución de los conjugados (50 mg de muestra en 50 ml de agua, ajustado a pH 7). Para la preparación de las soluciones se siguió el procedimiento descrito para la formación de partículas (punto 3.6) pero en este caso sin zeína. Posteriormente las diluciones se dejaron reposar durante cinco días para conducir a la precipitación del resveratrol no disuelto y se centrifugó 1000 rpm

(Centrifuga 5415R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) durante 10 min. Se utilizó el sobrenadante para diluirlo con el DMSO y realizar la medición a 307 nm.

Se llevaron a cabo diferentes tratamientos: caseinato-dextrano conjugado (Conj CD), caseinato no conjugado (Unconj C), caseinato-dextrano no conjugado (Unconj CD).

### 3.6 Método de producción de nanopartículas

Se prepararon muestras con zeína y resveratrol y muestras blanco (zeína). En primer lugar, se mezclaron 0,90 g de zeína, 0,045 g de resveratrol y 30 ml de etanol, se taparon con papel parafilm para evitar la evaporación del etanol y papel de aluminio para proteger de la luz y se mantuvieron en agitación suave durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de agitación las muestras se filtraron. Para las muestras blanco se siguió el mismo procedimiento pero con solamente 0,45 g de zeína y 15 ml de etanol 85%. La siguiente fase se basó en adicionar 5 ml de la muestra a vasos en agitación constante a 440 rpm con 25 ml de los conjugados (3,84 g del polvo de la muestra de 24 h en 150 ml de agua). El tiempo de agitación es de 2 min. Para la favorecer la evaporación del etanol se guardaron las muestras en una estufa de vacío a 30 °C durante 1h 30min y finalmente, se prepararon diluciones 1:20 para medir el tamaño y el potencial zeta.

Se llevaron a cabo diferentes tratamientos: caseinato-zeína no conjugado (Unconj CZ), caseinato-dextrano-zeína conjugado (Conj CDZ), caseinato-dextrano-zeína no conjugado (Unconj CDZ).

### 3.7 Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación es definida como el contenido de material activo que queda atrapado en la matriz polimérica. La eficiencia de encapsulación de las nanopartículas fue determinada mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia} = \left(1 - \frac{Resv_F}{Resv_E}\right) * 100 \quad \text{Ecuación (1)}$$

Donde  $\text{Resv}_E$  es el resveratrol contenido en la suspensión, y  $\text{Resv}_F$  es el resveratrol libre. El resveratrol libre fue evaluado mediante la determinación de la cantidad de resveratrol que fue recogido después de la utilización de un filtro de centrífuga a 4000 g durante 30 min (2 ml de muestra) como en estudios previos (Luo, 2011) la cantidad de resveratrol se cuantificó como se describe en el apartado 3.4, utilizando las muestras sin resveratrol como blanco.

### 3.8 Caracterización de las nanopartículas.

El diámetro de las partículas y el potencial zeta fueron medidos utilizando el equipo Malvern Instruments Zetasizer 3000, Particle Size Analyzer (figura 20). Las muestras fueron diluidas 20 veces y el pH reajustado para evitar dispersión múltiple del láser.

El potencial zeta se refiere al potencial eléctrico en la superficie interfacial de las partículas suspendidas. Sus unidades son milivoltios (mV). En el caso de proteínas, la variación es dependiente del pH. En la zona de valores de potencial zeta comprendida entre -30 y 30 mV nos encontramos en la zona de mayor inestabilidad de las partículas. La estabilidad aumenta conforme aumenta (de forma absoluta) el valor del potencial. La medición se realiza en una celda electroforética, con dos electrodos conectados a una fuente de poder y esto crea un campo eléctrico. Los coloides migran y dependiendo de su movimiento y dirección se tiene el valor del potencial zeta (Kosegarten-Conde, 2012).



**Figura 20.** Equipo Zetasizer 3000.

### 3.9 Estabilidad a luz ultravioleta

La estabilidad química del resveratrol se evaluó mediante la utilización de una cámara ultravioleta (figura 21). La prueba consiste en colocar placas Petri de 60 mm de diámetro con alícuotas de 5 ml de cada muestra que contiene resveratrol, en la cámara y exponerlas durante una hora a la luz (365 nm). La cantidad de resveratrol se cuantificó como se describe en el apartado 3.4, utilizando las muestras sin resveratrol como blanco. Para determinar el porcentaje de resveratrol se aplicó la ecuación 2:

$$\% \text{ trans-resveratrol} = 100 * (\text{GSE}_{\text{UV}} / \text{GSE}_{\text{TOTAL}}).$$
 Ecuación (2)



**Figura 21.** Cámara ultravioleta.

### 3.10 Digestión *in vitro*

Se utilizó el método estático estandarizado de la digestión *in vitro* basado en un consenso internacional descrito por Minekus (2014). Por un lado, se preparó el fluido gástrico simulado (SGF) con un pH 3 y por otro, el fluido intestinal simulado (SIF) con un pH 7 (tabla 5) y ambos fueron conservados en refrigeración.



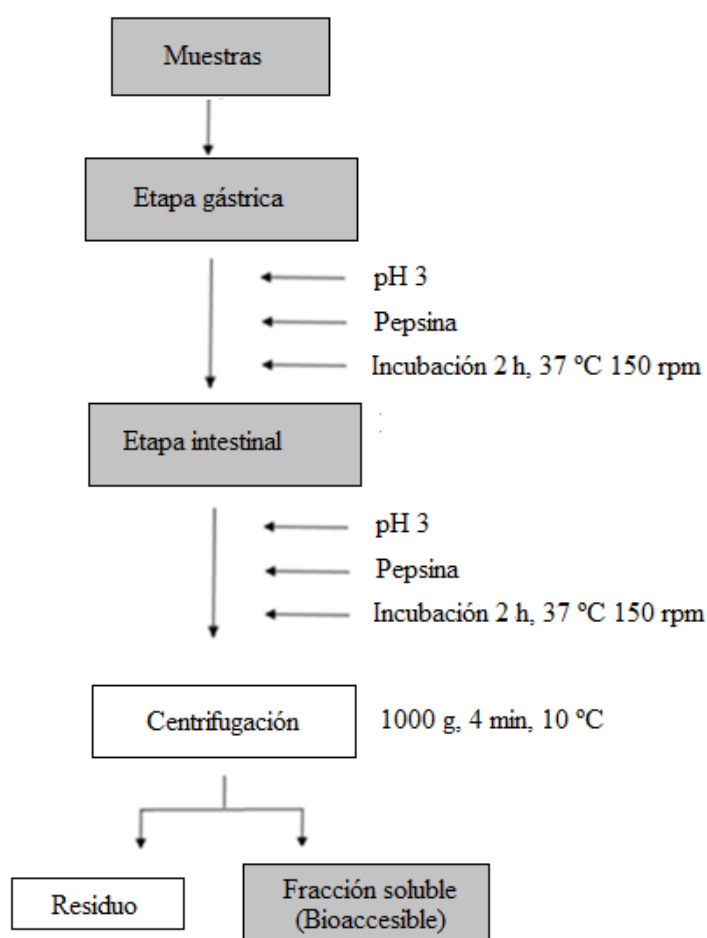
**Tabla 5.** Concentraciones de los constituyentes para el fluido gástrico (SGF) e intestinal (SIF).

Constituyente	SGF pH 3 (mmol/l)	SIF pH 7 (mmol/l)
KCl	5,52	5,44
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,72	0,64
NaHCO <sub>3</sub>	20,00	68
NaCl	37,76	30,72
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	0,08	0,26
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>2</sub>	0,40	-
NaOH	-	3,73
HCl	22,48	6,72
CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	0,07	0,30

- *Etapa gástrica.* En primer lugar, una alícuota de 1 ml de lecitina de soja (almacenada a -20 °C) fue secado en un rotavapor hasta sequedad. Se añadió 5 ml de SGF y se incubó a 37°C y 150 rpm durante 10 minutos. A continuación, se sometió a la solución a un baño de hielo en el ultrasonidos durante 20 minutos y se pasó por un filtro de jeringa de 0,22 µm para su uso en el mismo día. Simultáneamente, se disolvió 0,271 g de pepsina en 10 ml de SGF. A 10 ml de muestra se le adicionó 7,5 ml de SGF, 1,6 ml de la solución de pepsina, 5 µL de CaCl<sub>2</sub> 0,3 M, 0,2 mL de HCl 1M para ajustar el pH a 3 durante la digestión, 0,27 µL de lecitina y 0,425 µL de agua tipo I. Las muestras fueron colocadas en la incubadora a 37 °C y 150 rpm, durante 2 h y se protegieron de la luz.
- *Etapa intestinal.* Se prepararon soluciones de pancreatina (0,16 g en 20 ml de SIF) y sales biliares (0,9972 g en 20 ml de la solución SIF). 15 ml del quimo gástrico es mezclado con 6,37 ml de la solución stock SIF, 3,75 ml de la solución de pancreatina, 3,76 ml de bilis, 30 µL de CaCl<sub>2</sub> 0,3 M, 0,112 mL de NaOH 1M para alcanzar el pH 7 y 0,978 ml de agua. A continuación, las muestras se colocaron en la incubadora en las mismas condiciones anteriormente citadas durante 2 h. Además, se utilizó el microscopio para dar un seguimiento a las microestructuras presentes en la digestión.
- *Determinación de la bioaccesibilidad.* Las muestras después de la digestión *in vitro* fueron centrifugadas a 10000 g, durante 40 minutos a 10 °C. El sobrenadante

se filtró utilizando un filtro jeringa de PVDF de 0,45 µm. La cantidad de resveratrol en el filtrado se determinó como se describe en el apartado 3.4, utilizando las muestras sin resveratrol como blanco (figura 22). El resveratrol contenido en el sobrenadante se considera el resveratrol presente en la fase micelar y por tanto bioaccesible. Para estimar la bioaccesibilidad se ha utilizado la ecuación 3:

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = 100 * \left( \frac{\text{resv micela después de la digestión (\mu\text{g/ml})}}{\text{resv total tiempo 0 (\mu\text{g/ml})}} \right) \quad \text{Ecuación (3)}$$



**Figura 22.** Esquema del proceso de determinación de la bioaccesibilidad mediante el método de digestión gastrointestinal *in vitro*

### 3.11 Análisis estadístico

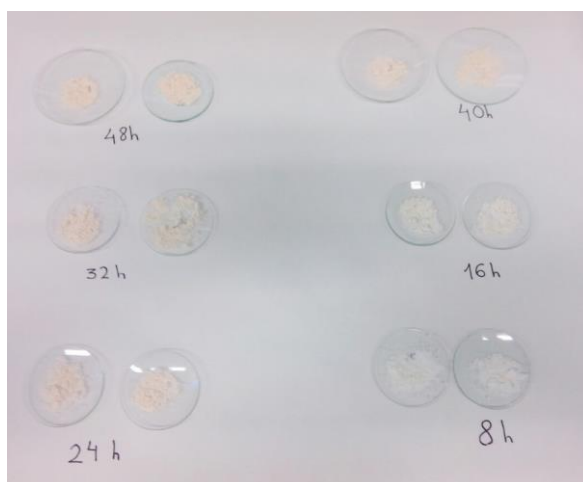
Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se dan como valores medios  $\pm$  desviación estándar. Para la interpretación de los datos se empleó un análisis

estadístico ANOVA y la prueba *post hoc* de Tukey con un nivel de confianza del 95 %.  
Se utilizó el programa SPSS Statistics 22.

## 4. Resultados y discusión

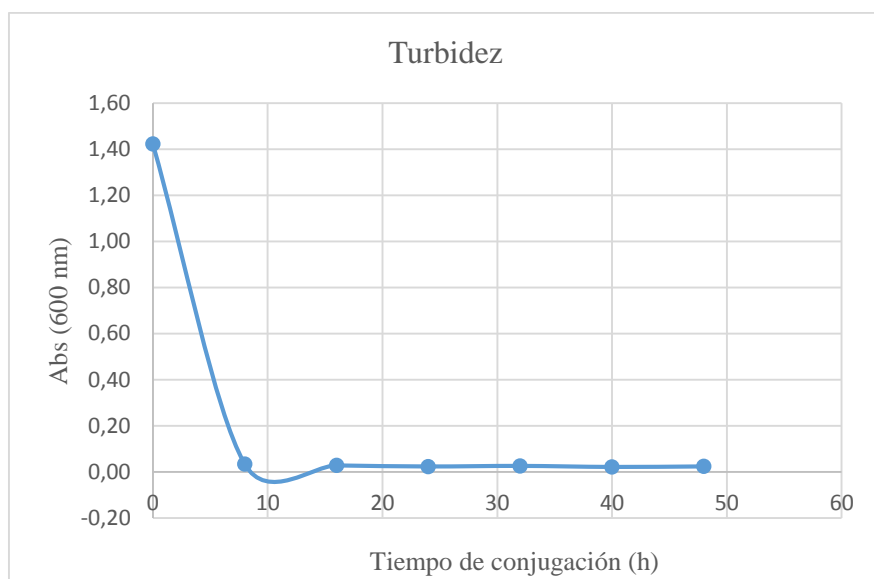
### 4.1 Cinética del proceso de conjugación

Para estudiar la cinética del proceso de conjugación entre el caseinato sódico y el dextrano, se siguió la evolución de la reacción de Maillard (formación de los conjugados) durante 48 h, en intervalos de 8 h, con las muestras que se introdujeron en las estufa en las condiciones de temperatura y humedad relativa adecuadas para conseguir que se formasen los conjugados (punto 3.2). El objetivo de estas experiencias era seleccionar el tiempo en el que se ha producido un mayor porcentaje de conjugación sin que los conjugados evolucionen hacia la segunda etapa de la reacción de Maillard. Las muestras que se obtuvieron se pueden ver en la figura 23.

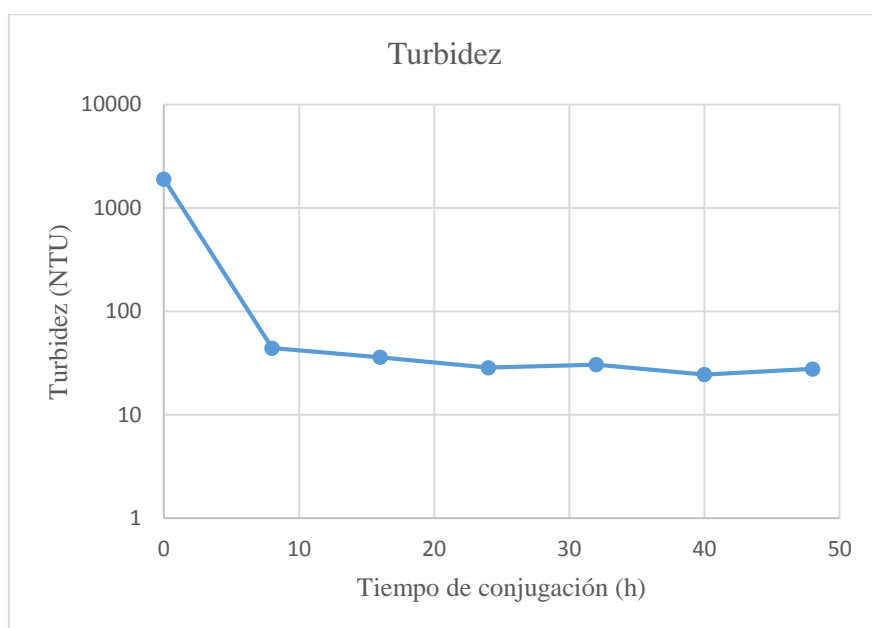


**Figura 23.** Cinética en la formación de conjugados.

Con las muestras solubilizadas en agua tipo I se realizaron una serie de ensayos para determinar la caracterización de la conjugación. Estos experimentos consistieron en los análisis de turbidez, OPA y pardeamiento. Los resultados de turbidez en función de la metodología aplicada se muestran en las figuras 24 y 25.



**Figura 24.** Evolución de la turbidez durante el proceso de conjugación caseinato-dextrano mediante la reacción de Maillard.

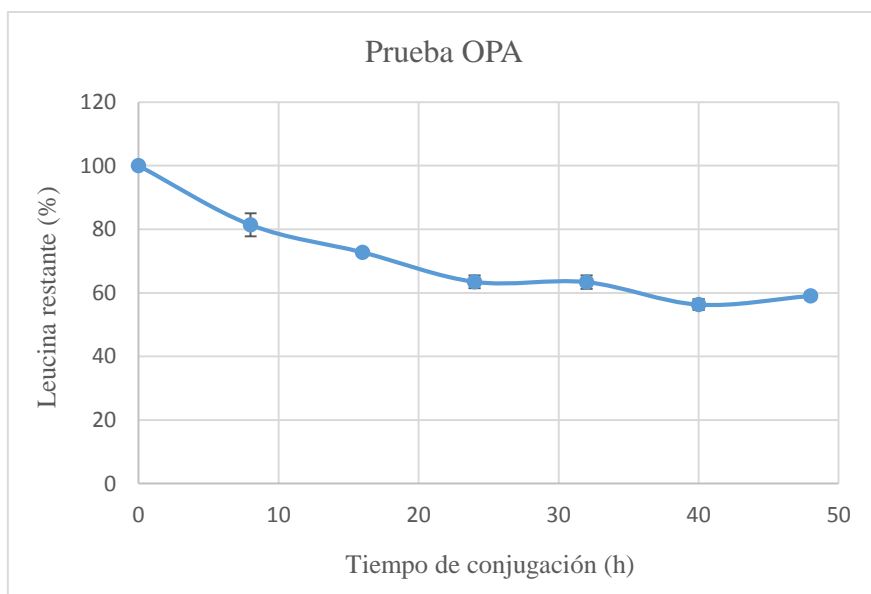


**Figura 25.** Evolución de la turbidez a través de la utilización del turbidímetro en el proceso de conjugación caseinato-dextrano mediante la reacción de Maillard.

El objetivo de las pruebas de turbidez se basa en el estudio de la formación de agregados de proteína en el punto isoeléctrico del caseinato de sodio (pH 4,6), así cuantos más agregados posea más turbia se observa la muestra a analizar. El estudio de Markman (2012) mostró que el uso de conjugados como agentes de encapsulación proporciona

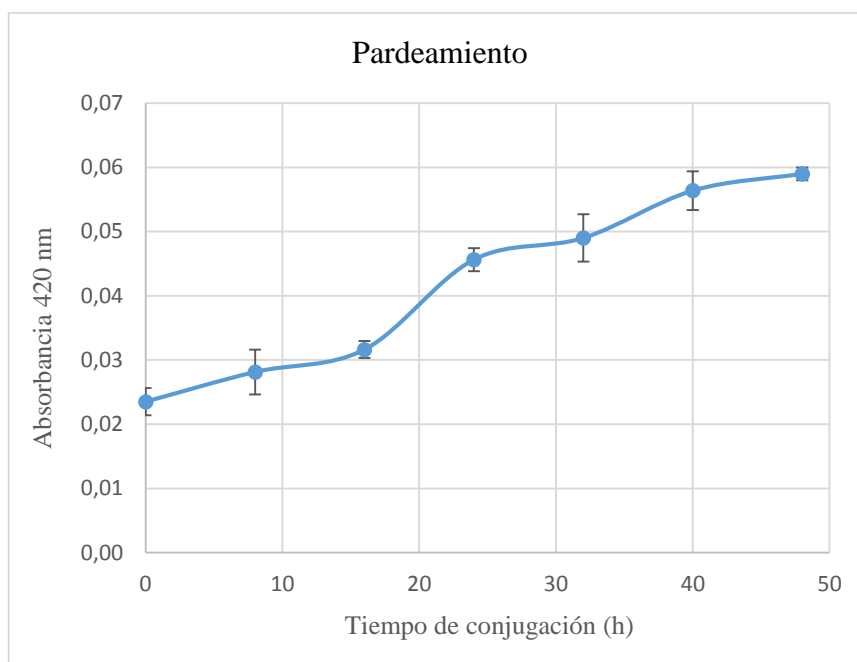
ventajas como, diámetros de partícula más pequeños y además, la solución era más transparente con respecto a la dispersión del material de núcleo o a la mezcla proteína-polisacárido con el material activo. En las figuras 24 y 25 se observa la reducción de la turbidez con el tiempo de conjugación y destaca el descenso que se produce de 0 a 8 h. Por tanto, se persigue la búsqueda de pocos agregados, ya que una cantidad excesiva puede conducir a la desestabilización.

Se recurrió al método OPA para analizar el grado de conjugación mediante la cuantificación de los grupos amino restantes en la proteína y establecer una relación con la cantidad de dextrano que se ha conjugado por proteína después de la reacción de Maillard. Los resultados de este ensayo se presentan en la figura 26. Con el transcurso del tiempo de conjugación, la cantidad de leucina restante disminuye indicando la formación de conjugados. A las 24 h de conjugación, la cantidad de leucina restante fue de 63,49 % dando lugar a un porcentaje de conjugación del 37 % aproximadamente. A partir de 24 h se observa una estabilidad en los grupos aminos que reaccionan con el dextrano.



**Figura 26.** Evolución de la leucina restante en la prueba de orto-ftaldehído (OPA).

La evolución de la reacción de Maillard se determinó mediante la medición de la absorbancia a 420 nm que indica la formación de colores pardos (figura 27). En este caso, es importante la elección de colores menos pardeados para evitar la segunda etapa de Maillard, que puede afectar a los conjugados de caseína y dextrano.



**Figura 27.** Evolución del pardeamiento durante el proceso de conjugación mediante la medición de la absorbancia a 420 nm.

Con los gráficos anteriores, se tiene en cuenta que, a partir de 24 h la formación de conjugados se estabiliza. Por tanto, se seleccionó la muestra de 24 h porque es estable y porque los colores del pardeamiento son más bajos en comparación con tiempos de conjugación superiores. Esta muestra es la elegida para su uso en la producción de las nanopartículas mediante el método de precipitación anti-solvente.

## 4.2 Solubilidad del resveratrol

Se utilizaron diferentes concentraciones de GSE (extracto de piel de uva) que se integraron en la solución de conjugados ajustada a pH 7 realizando el mismo procedimiento que para la producción de las nanopartículas. El reposo de las muestras durante cinco días permitió que el resveratrol no disuelto precipitase y tras la centrifugación, se utilizó el sobrenadante para la medición del resveratrol disuelto (figura 28).

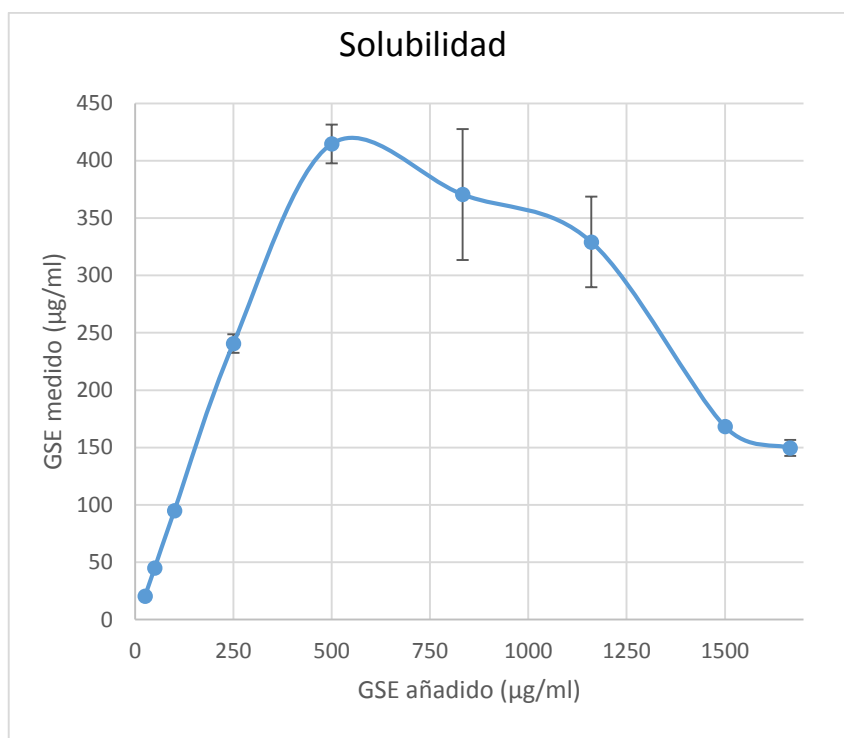


**Figura 28.** Solubilidad del resveratrol a diferentes concentraciones. De izquierda a derecha: 100 µg/ml, 250 µg/ml y 500 µg/ml.

La figura 29 representa el GSE añadido y el GSE medido y se observa que la solubilización del extracto tiene lugar hasta 500 µg/ml. En ese punto, la concentración de resveratrol medida fue de 414 µg/ml (aproximadamente un 83 % del resveratrol añadido) y esto muestra que una parte del resveratrol cristalizó y se precipitó.

En el grafico se comprueba que, desde una cantidad de 750 µg/ml en adelante, presenta inestabilidad y que la cantidad de resveratrol disuelto disminuye y la proteína no lo retiene, por lo tanto el resveratrol precipita. Por consiguiente, la precipitación es más rápida que la conjugación (sobresaturación). En las investigaciones de Acharya (2013) se estudiaron las interacciones entre el resveratrol y el caseinato de sodio. Estos estudios concluyeron que el proceso de complejación entre la proteína y el polifenol es espontánea y que implica interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno (Acharya, 2013). Además, el caseinato de sodio incrementa la solubilidad del resveratrol (Davidov-Pardo, 2015).





**Figura 29.** Solubilidad de diferentes concentraciones de GSE en la solución de conjugados.

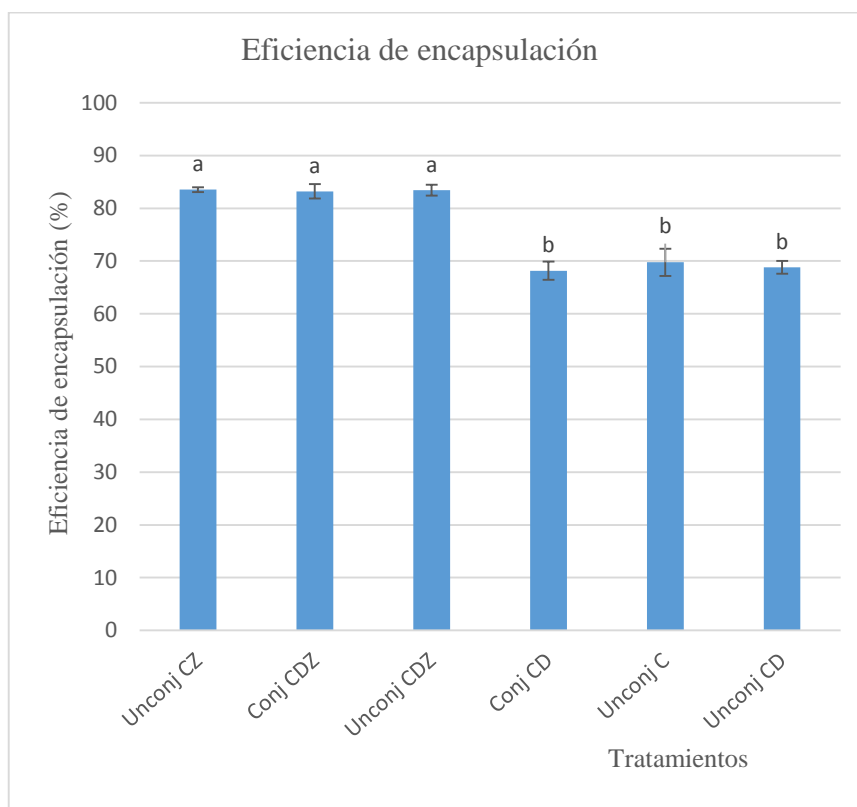
El análisis de los resultados sugiere que la cantidad seleccionada sea de 250 µg/ml, por debajo del nivel de saturación. De esta forma, se conoce el resveratrol que se adiciona en la producción de las nanopartículas.

### 4.3 Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación de las diferentes formulaciones utilizadas se muestra en la figura 30. El análisis estadístico (ANOVA y prueba de Tukey) determina que los tratamientos empleados se dividen en dos subconjuntos homogéneos en función de la eficiencia de encapsulación: por un lado, las nanopartículas que utilizan zeína y por el otro, los tratamientos con los complejos sin zeína.

Se observó que los tratamientos que contenían zeína presentaron mayor eficiencia de encapsulación del resveratrol, aproximadamente un 83 % con respecto a la obtenida en los complejos (68 %). Los valores fueron semejantes a estudios en los que el resveratrol fue recubierto con zeína mediante el método de precipitación antisolvente (Davidov-Pardo, 2015).

Por lo tanto, el uso de las proteínas caseinato y zeína mejoró significativamente la eficiencia de encapsulación del resveratrol. Además, se observó el papel que desempeña el caseinato en la eficiencia de encapsulación del resveratrol en el caso de los complejos biopoliméricos. El estudio de Acharya (2013) indicó que las interacciones hidrofóbicas y los enlaces de hidrógeno son los causantes de la fuerte afinidad entre el resveratrol y el caseinato de sodio. Por tanto, el incremento de la eficiencia puede deberse a que la hidrofobicidad de la zeína es mayor que la del caseinato.

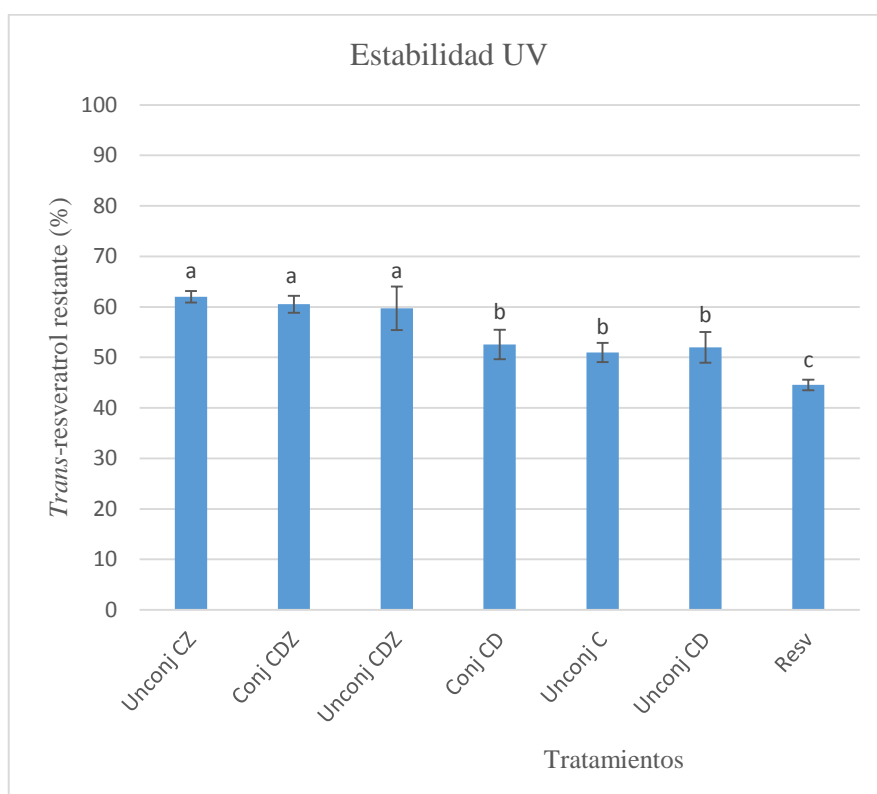


**Figura 30.** Eficiencia de encapsulación en los tratamientos empleados (valor medio  $\pm$  desviación estándar). Caseinato-zeína no conjugado (Unconj CZ), caseinato-dextrano-zeína conjugado (Conj CDZ), caseinato-dextrano-zeína no conjugado (Unconj CDZ), caseinato-dextrano conjugado (Conj CD), caseinato no conjugado (Unconj C), caseinato-dextrano no conjugado (Unconj CD). <sup>a-b</sup> indican diferencias significativas entre los tratamientos empleados ( $p < 0,05$ ) según ANOVA y la prueba *post-hoc* Tukey.

#### 4.4 Pruebas estabilidad UV

Tras la producción de las nanopartículas, se midió la cantidad de *trans*-resveratrol que queda después de someterlo a la luz UV. La exposición del *trans*-resveratrol a la luz UV, a temperatura ambiente y en presencia de oxígeno, produce una transformación muy rápida de *trans*- a *cis*-resveratrol (Lucas Abellán, 2009). Se conoce que *trans*-resveratrol ejerce mayores efectos nutraceuticos con respecto a *cis*-resveratrol (Fauconneau, 1997; Rius, 2010).

Esta prueba se realizó con las muestras de resveratrol libre y encapsulado, tanto en las nanopartículas de zeína como en los complejos con caseinato. En la figura 31 se muestra la cantidad de *trans*-resveratrol restante en los diferentes tratamientos después de la exposición a la luz UV durante 1 h a 365 nm.



**Figura 31.** Cantidad de *trans*-resveratrol restante (%) en las pruebas de estabilidad UV (valor medio  $\pm$  desviación estándar). Caseinato-zeína no conjugado (Unconj CZ), caseinato-dextrano-zeína conjugado (Conj CDZ), caseinato-dextrano-zeína no conjugado (Unconj CDZ), caseinato-dextrano conjugado (Conj CD), caseinato no conjugado (Unconj C), caseinato-dextrano no conjugado (Unconj CD) y resveratrol (Resv). <sup>a-c</sup> indican diferencias significativas entre los tratamientos empleados ( $p < 0,05$ ) según ANOVA y la prueba post-hoc Tukey.

Se observa que la protección contra la luz UV fue aportada principalmente por la proteína zeína que contiene grupos laterales aromáticos y dobles enlaces que pueden absorber la luz ultravioleta (Luo, 2013). Otras investigaciones previas (Luo, 2012) han reportado observaciones similares en sus estudios indicando que, las proteínas absorben la luz UV y por lo tanto, protegen a los materiales que son tan sensibles a la luz UV (Luo, 2013).

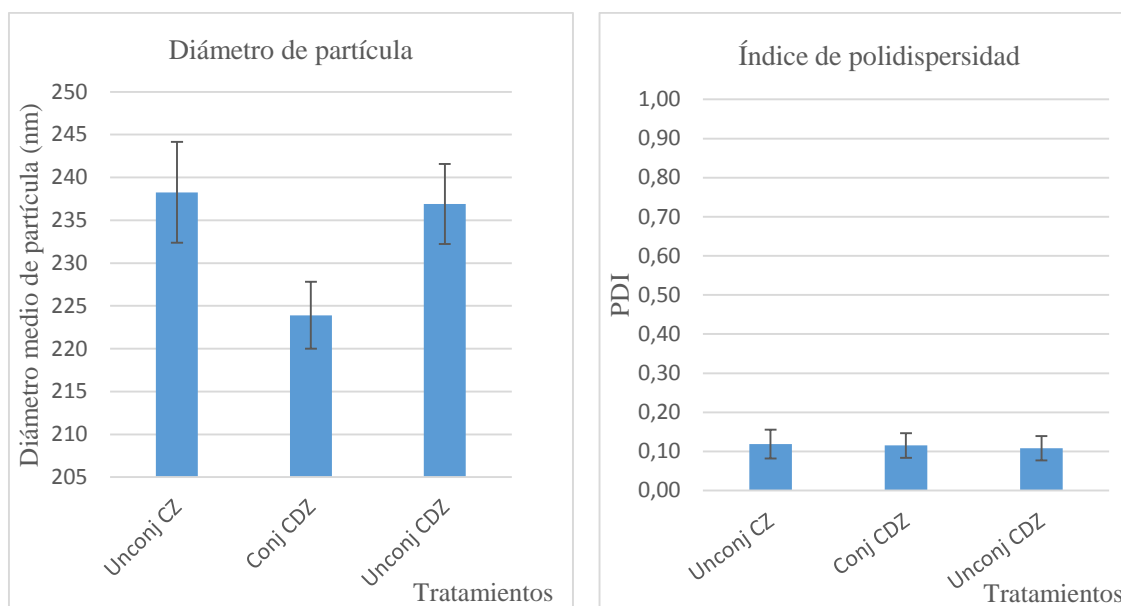
Además, la protección ligeramente superior de las nanopartículas puede deberse a que favorecen la dispersión de la luz como consecuencia de la turbidez causada por la zeína (McClements, 2005 en Davidov-Pardo, 2015).

Por tanto, los análisis estadísticos indican que los subconjuntos homogéneos son por un lado, el resveratrol, por otro lado son las partículas con zeína y por último, los complejos, que proporcionan una estabilidad intermedia contra la luz ultravioleta. En consecuencia, la aplicación de los tratamientos es una vía para ofrecer protección al resveratrol de la luz UV.

#### 4.5 Tamaño y potencial zeta de las nanopartículas de zeína.

Las nanopartículas de zeína fueron caracterizadas mediante la medición del tamaño medio de partícula (figura 32) e índice de polidispersidad y el potencial zeta (figura 33).

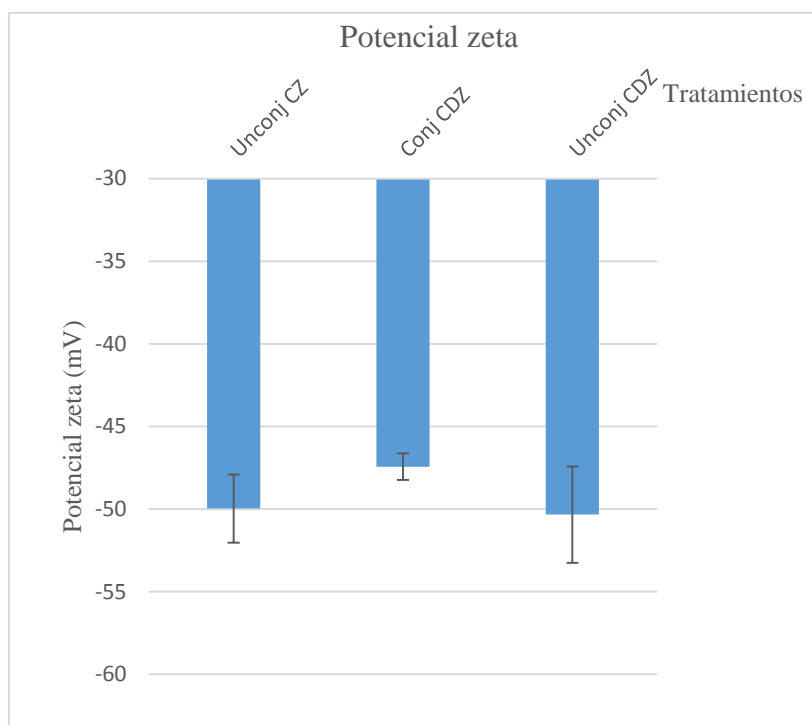
Además del diámetro medio de partícula también es importante conocer su distribución, es decir, si son mono o polidispersas. Cuando todas las partículas de la solución presentan un tamaño semejante se consideran monodispersas mientras que, si por el contrario, presentan variabilidad dan lugar a un índice de polidispersidad (PDI). Por tanto, este índice provee información sobre la muestra: valores cercanos a 0 indican que es monodispersa y si los valores se encuentran cercanos a la unidad, presenta gran variedad de tamaños (Lancheros, 2014).



**Figura 32.** Diámetro medio de partícula e índice de polidispersidad (PDI) para los tratamientos con nanopartículas con zeína (valor medio  $\pm$  desviación estándar). Caseinato-zeína no conjugado (Unconj CZ), caseinato-dextrano-zeína conjugado (Conj CDZ), caseinato-dextrano-zeína no conjugado (Unconj CDZ).

Las nanopartículas con zeína presentaron un diámetro medio de partícula pequeño con índices de polidispersidad relativamente bajos, indicando que la distribución del tamaño era uniforme. Al realizar una comparativa entre las partículas caseinato-zeína no conjugado y las partículas con caseinato-dextrano-zeína no conjugado, se observa que el diámetro medio de partícula y que el potencial zeta son semejantes y que, por tanto, el dextrano no presenta una influencia importante. Es conocido que, la reducción de tamaño de partícula del sistema encapsulado podría mejorar la absorción de fármacos en las células del material activo nanoencapsulado (Luo, 2011).

En cuanto al potencial zeta (figura 33), los resultados revelaron que los tratamientos con nanopartículas de zeína se encontraban en la zona de estabilidad, alcanzando los -50 mV. El potencial zeta del tratamiento caseinato-dextrano-zeína conjugado es inferior con respecto a los no conjugados. Según el estudio de Lesmes (2012), el diámetro medio de partícula no se ve afectado por la presencia del dextrano, lo que concuerda con nuestros resultados. Sin embargo, los estudios mostraron que la adición de dextrano disminuyó el potencial zeta de las soluciones.



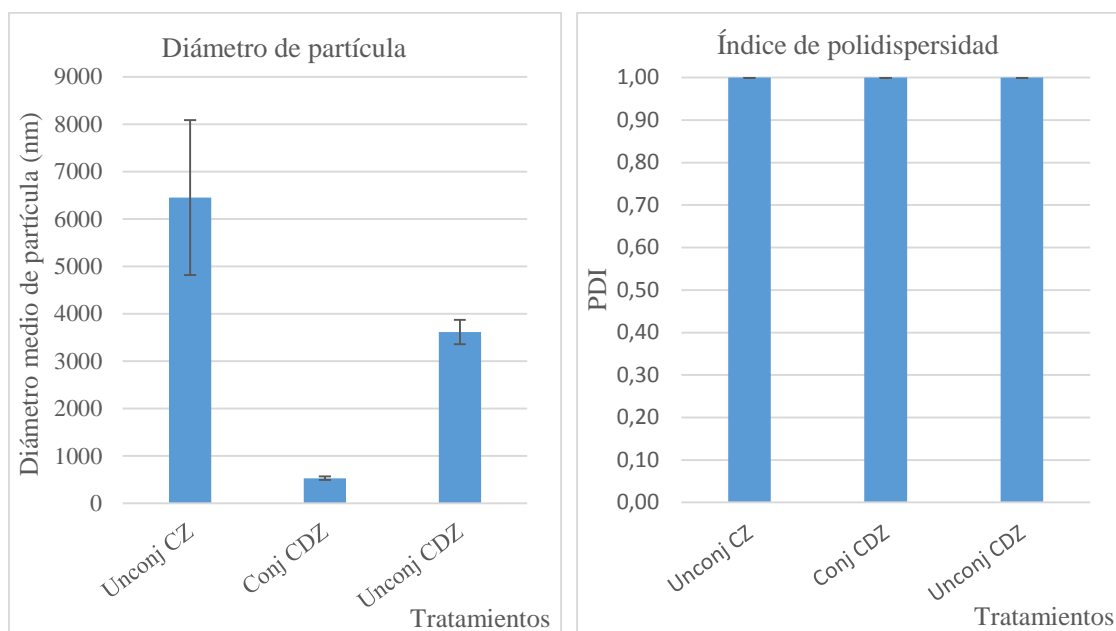
**Figura 33.** Potencial zeta (mV) para los tratamientos con nanopartículas con zeína (valor medio  $\pm$  desviación estándar). Caseinato-zeína no conjugado (Unconj CZ), caseinato-dextrano-zeína conjugado (Conj CDZ), caseinato-dextrano-zeína no conjugado (Unconj CDZ).

## 4.6 Seguimiento de la digestión *in vitro*

Se realizó un seguimiento de las nanopartículas con zeína en un sistema de digestión *in vitro* que simulaba la etapa gástrica y la etapa intestinal.

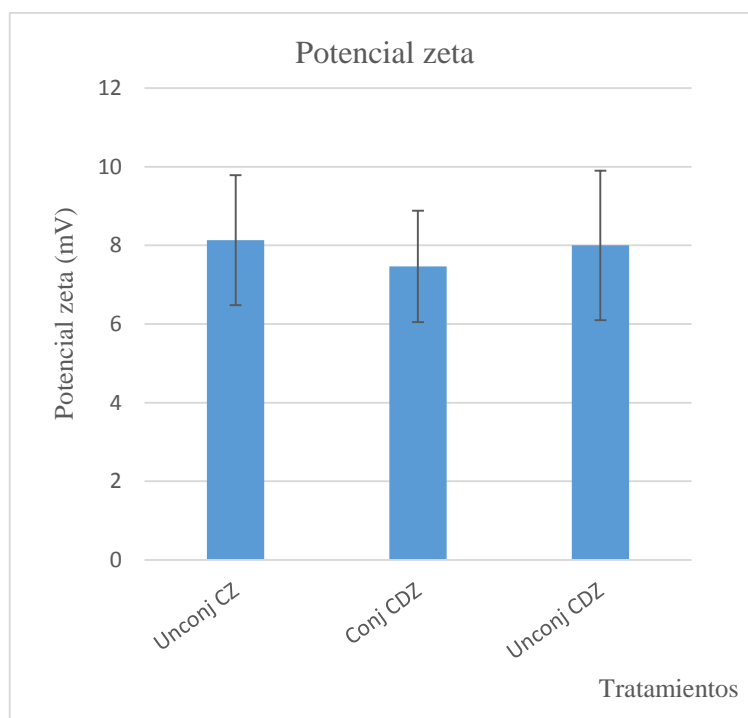
### 4.6.1 Fase gástrica

Las nanopartículas con zeína fueron sometidas al fluido simulado de la fase gástrica. La enzima principal que actúa en esta etapa es la pepsina. Se trata de una enzima proteolítica que se segrega en el estómago con el fin de hidrolizar proteínas (Ramos, 1995). Esta enzima es más activa con un pH entre 2 y 3. La etapa gástrica está simulada para un pH 3.



**Figura 34.** Diámetro medio de partícula e índice de polidispersidad (PDI) para los tratamientos con nanopartículas con zeína en la fase gástrica (valor medio  $\pm$  desviación estándar). Caseinato-zeína no conjugado (Unconj CZ), caseinato-dextrano-zeína conjugado (Conj CDZ), caseinato-dextrano-zeína no conjugado (Unconj CDZ).

Se observa en la figura 34 que con la presencia de dextrano se reduce la actividad de la pepsina a diferencia de lo que ocurre en el tratamiento sin dextrano en el cual la pepsina ataca más fácilmente a las nanopartículas, rompiendo así su estructura. De los tratamientos utilizados en los ensayos, el tratamiento conjugado con zeína fue el más estable y presentaba un tamaño medio de partícula más pequeño (500 nm). El aumento de tamaño puede deberse a la agregación de las proteínas. Además, en la figura destaca la inestabilidad de las partículas en la fase gástrica para el tratamiento que no ha utilizado dextrano.



**Figura 35.** Potencial zeta (mV) para los tratamientos con nanopartículas con zeína en la fase gástrica (valor medio  $\pm$  desviación estándar). Caseinato-zeína no conjugado (Unconj CZ), caseinato-dextrano-zeína conjugado (Conj CDZ), caseinato-dextrano-zeína no conjugado (Unconj CDZ).

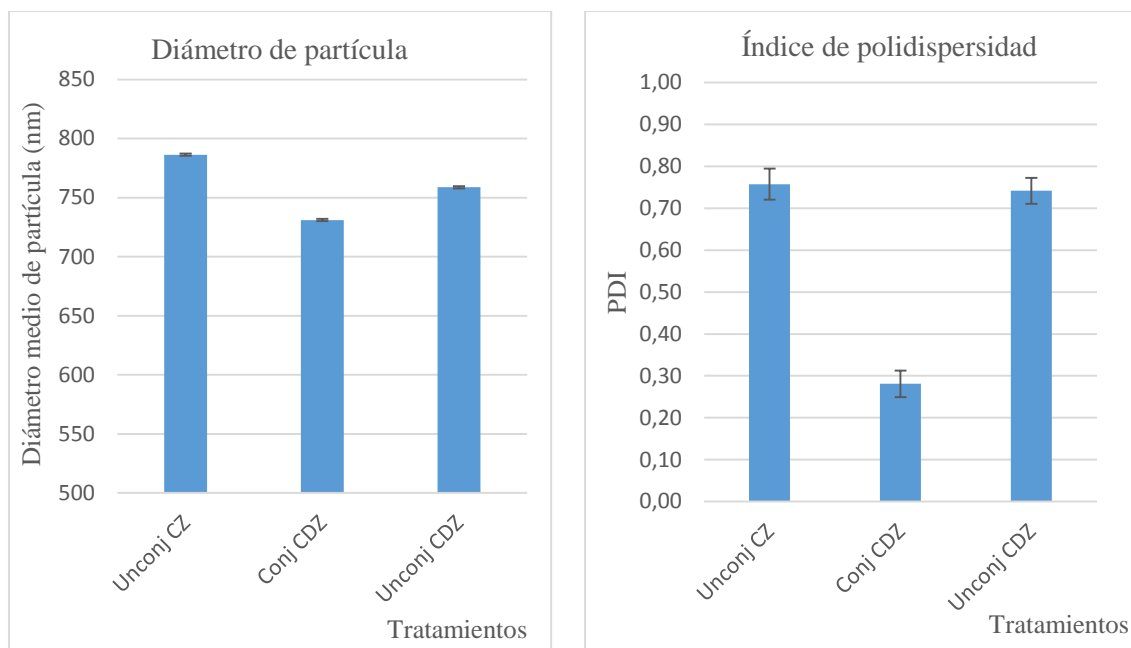
En la etapa gástrica, los índices de polidispersidad son más elevados debido a que los tratamientos se encuentran en una zona de inestabilidad. La actividad de la pepsina es el factor condicionante de la pérdida de estabilidad, pero también pueden influir los cambios de pH (Lesmes, 2012). Se observa que el potencial zeta en los diferentes tratamientos se encuentra cercano a cero y por debajo del punto isoeléctrico de las proteínas (figura 35). La falta de agregación y los valores del potencial zeta en el tratamiento con conjugado apoyan el papel del impedimento estérico por las moléculas de dextrano en la interfaz de las nanopartículas para evitar la agregación de proteínas (Yi, 2014).

#### 4.6.2 Fase intestinal

La figura 36 representa el tamaño medio de partícula e índice de polidispersidad para los distintos tratamientos durante la fase intestinal. El tamaño medio de partícula en la etapa intestinal se encuentra en torno a los 800 nm. En la fase gástrica se observó que el tratamiento conjugado con zeína fue el más estable, sin embargo en la fase intestinal mostró el mismo comportamiento que el resto de los tratamientos. Por este motivo, se

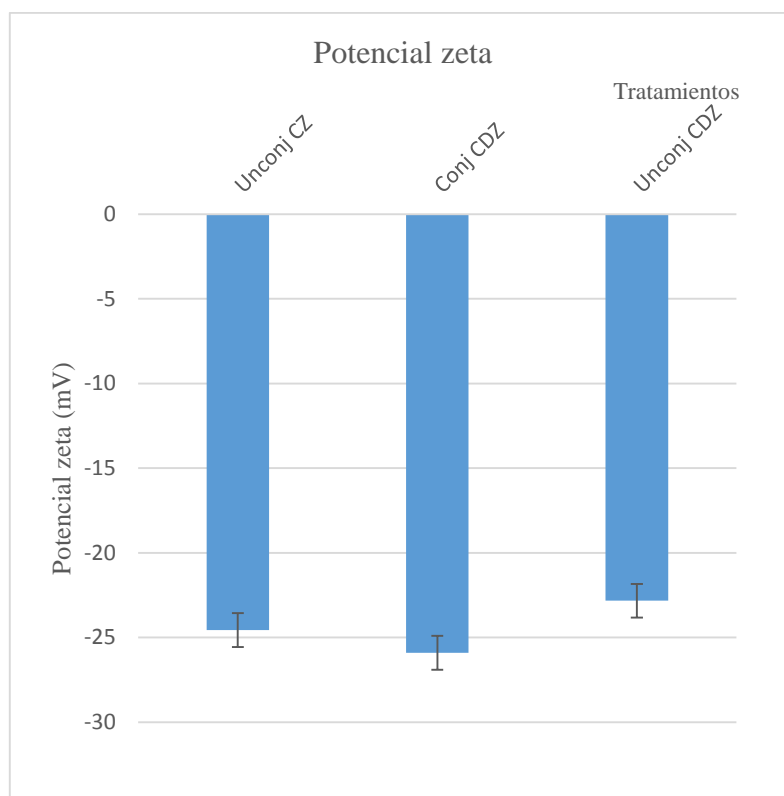


realizó otro ensayo de digestión para este tratamiento y como consiguiente, comprobar si la desestabilización es debida a las sales biliares o a la pancreatina (punto 4.6.3). Los índices de polidispersidad en esta etapa presentan que, el tratamiento caseína-dextrano-zeína conjugado son los más estables con tamaños semejantes entre las partículas de la solución, debido posiblemente a la menor hidrólisis de la pepsina y de la pancreatina.



**Figura 36.** Diámetro medio de partícula e índice de polidispersidad (PDI) para los tratamientos con nanopartículas con zeína en la fase intestinal (valor medio  $\pm$  desviación estándar). Caseinato-zeína no conjugado (Unconj CZ), caseinato-dextrano-zeína conjugado (Conj CDZ), caseinato-dextrano-zeína no conjugado (Unconj CDZ).

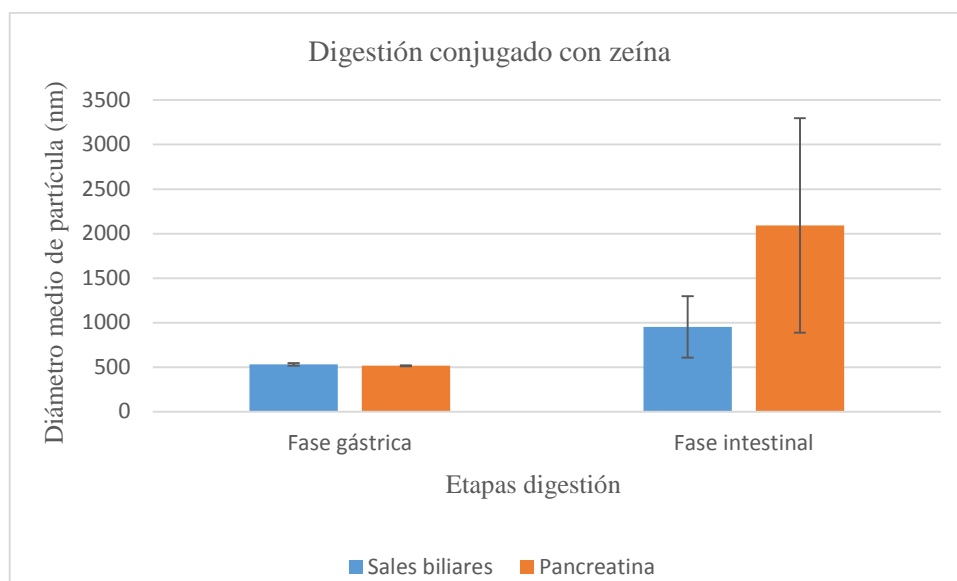
El potencial zeta (figura 37) de las partículas es negativo (aproximadamente de -23 mV) debido al pH del medio, que se encuentra por encima del punto isoeléctrico de las proteínas. Además, los valores indican inestabilidad en el sistema.



**Figura 37.** Potencial zeta (mV) para los tratamientos con nanopartículas con zeína en la fase intestinal (valor medio  $\pm$  desviación estándar). Caseinato-zeína no conjugado (Unconj CZ), caseinato-dextrano-zeína conjugado (Conj CDZ), caseinato-dextrano-zeína no conjugado (Unconj CDZ).

#### 4.6.3 Digestión para el tratamiento conjugado con zeína

El objetivo de este punto consiste en la evaluación de la influencia en el tamaño medio de las partículas, de las sales biliares y la pancreatina en la fase intestinal. En este caso se realizó la digestión simulada en el tratamiento conjugado con zeína porque demostró que permanecía estable en la etapa gástrica y posteriormente, en la etapa intestinal se comportó de forma semejante a los tratamientos no conjugados. En la figura 38 se muestra el aumento del tamaño medio de partícula de 500 nm en la fase gástrica a 900 nm en la fase intestinal simulada con sales biliares. Sin embargo, el incremento que se produce en la digestión con pancreatina es más pronunciada.



**Figura 38.** Etapas de la digestión con sales biliares y con pancreatina para el tratamiento conjugado con zeína (valor medio  $\pm$  desviación estándar).

A partir de los resultados obtenidos en este ensayo se observa que, la pancreatina es en mayor medida la principal causante de la desestabilización.

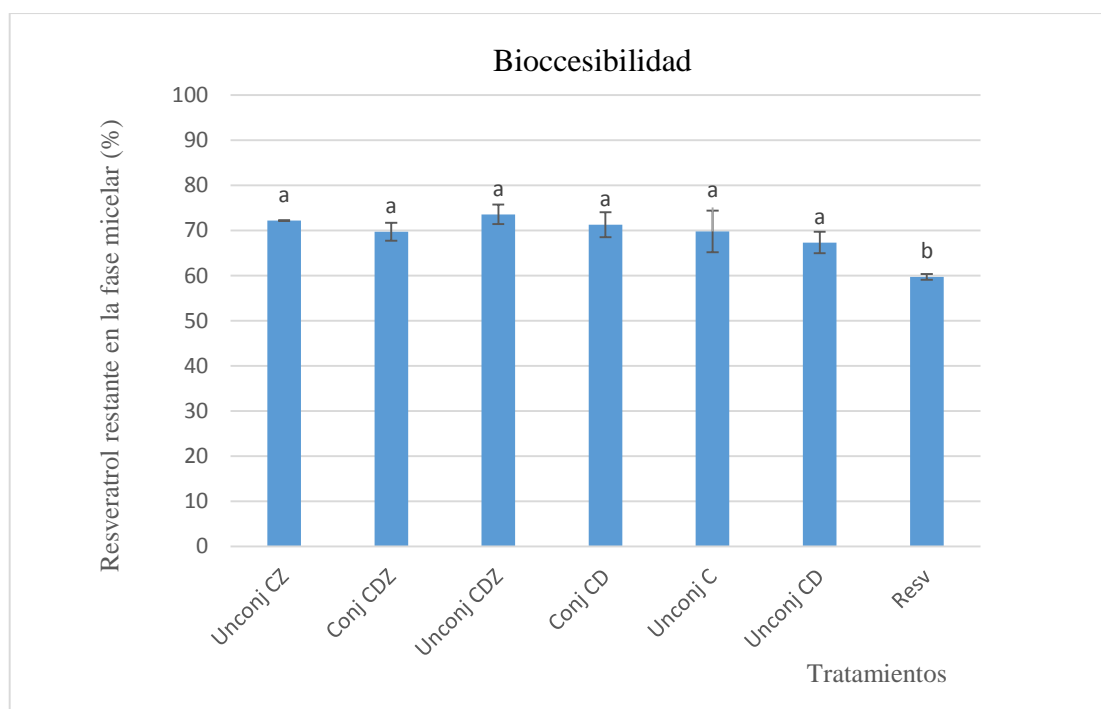
#### 4.7 Bioaccesibilidad

La aplicación de los efectos beneficiosos del resveratrol es muy limitada debido a sus propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas como la baja solubilidad y la inestabilidad que presenta en un medio biológico, la baja biodisponibilidad y la rápida eliminación sistemática (Zhou, 2015).

El proceso digestivo consiste en una serie de etapas enzimáticas que producen la hidrólisis de los componentes mayoritarios del alimento (grasas, hidratos de carbono y proteínas) con la consiguiente liberación de numerosos nutrientes. La herramienta para la evaluación de la biodisponibilidad es la bioaccesibilidad, relación entre la concentración bioaccesible o soluble de una sustancia y la concentración total de la sustancia presente en la muestra. La definición según Ng, (2009) es que la bioaccesibilidad se entiende como la solubilización de un determinado compuesto de la matriz alimentaria durante el proceso de digestión gastrointestinal. La bioaccesibilidad es indicativa de la máxima cantidad que puede absorberse por el epitelio intestinal y por ello, se utiliza como indicador de la

máxima biodisponibilidad oral. El parámetro de bioaccesibilidad aporta información sobre la cantidad máxima de un compuesto que puede llegar a la circulación, lo que se entiende como máxima biodisponibilidad oral (Torres Escribano, 2010).

Se ha determinado la bioaccesibilidad del resveratrol en los diferentes tratamientos empleados (figura 39) mediante la medición de la cantidad de resveratrol restante en la fase micelar después del proceso de la digestión *in vitro*. El resveratrol que permanece en las micelas está disponible y puede ser bioaccesible. La bioaccesibilidad, varía entre el 59,72 % y 73,56 % y se observa que el resveratrol presenta una biodisponibilidad limitada por su baja bioaccesibilidad en el intestino delgado.



**Figura 39.** Bioaccesibilidad del resveratrol (%) (valor medio  $\pm$  desviación estándar). Caseinato-zeína no conjugado (Unconj CZ), caseinato-dextrano-zeína conjugado (Conj CDZ), caseinato-dextrano-zeína no conjugado (Unconj CDZ), caseinato-dextrano conjugado (Conj CD), caseinato no conjugado (Unconj C), caseinato-dextrano no conjugado (Unconj CD) y resveratrol (Resv). <sup>a-b</sup> indican diferencias significativas entre los tratamientos empleados ( $p < 0,05$ ) según ANOVA y la prueba post-hoc Tukey.

Se observa en la figura 39 que los tratamientos que incrementan la bioaccesibilidad para la absorción del resveratrol son caseinato-dextrano-zeína no conjugado (73,56 %), y caseinato-zeína no conjugado (72,19 %). Todos los tratamientos mejoraron la

bioaccesibilidad del resveratrol cuando se compara con el resveratrol disuelto en agua que presentó una bioaccesibilidad de 59,72 %.

Estudios anteriores utilizaron sistemas *in vitro* para demostrar la viabilidad de las partículas con zeína como sistemas de protección de nutraceuticos hidrófobos (Luo, 2011).

## 5. Conclusiones

Debido a los límites que presenta el resveratrol como ingrediente funcional, este estudio se ha basado en la posibilidad de la utilización de nanopartículas y complejos biopoliméricos para su estabilización e incremento de su bioaccesibilidad. De los tratamientos empleados, las nanopartículas con zeína mostraron altas eficiencias de encapsulación, aproximadamente del 83 % a diferencia de las obtenidas para los complejos biopoliméricos (70 %). Las pruebas de estabilidad a la luz UV revelaron que todos los tratamientos utilizados ayudaban a proteger al compuesto activo.

Por tanto, se determinó que la nanoencapsulación y la formación de complejos biopoliméricos contribuían al aumento de la bioaccesibilidad y estabilidad del resveratrol. En conclusión, los tratamientos con nanopartículas de zeína elaboradas mediante el método de precipitación antisolvente son más eficaces, sin embargo su aplicación en la industria alimentaria es más limitada debido a la coloración que presenta.

## 6. Bibliografía

- Acharya, D. P.; Sanguansri, L.; Augustin, M. A. (2013) Binding of resveratrol with sodium caseinate in aqueous solutions. *Food Chemistry* 141, 1050–1054.
- Aldana, A.S.; Sandoval, E.R.; Aponte, A.A. (2004). Encapsulación de aditivos para la industria de alimentos. *Ingeniería y Competitividad*, 6 (2), 73-83.
- Anekonda, T.S.; Reddy, P.H. (2006). Neuronal protection by sirtuins Alzheimer's disease. *Neurochem*, 96, 305.
- Arcan, I.; Yemenicioglu, A. (2011). Incorporating phenolic compounds opens a new perspective to use zein films as flexible bioactive packaging materials. *Food Research International* 44, 550-556.
- Augustin, M. A.; Sanguansri, L.; Lockett, T. (2013) Nano- and micro-encapsulated systems for enhancing the delivery of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Science* 1290, 107-112
- Aura, A. M. (2008). Microbial metabolism of dietary phenolic compounds. *Phytochem. Rev.*, 7: 407-429.
- Barberá, Mateos, J. M.; Marcos, A.; Aguilera, Garca, C.; Esperanza, Díaz, L.; Duarte de Prato, A.; Gálvez, Peralta, J.; Gil, Hernández, A.; Gómez, S.; Gonzalez-Gross, M.; Granado, Lorencio, F.; Guarner, F.; Martinez, Augustin, O.; Nova, E.; Olmedilla, Alonso, B.; Pujol-Amat, P.; Ramos, E.; Romeo, J.; Miguel, Tobal, F. Ramón, Vidal, D.; Wärneberg, J.; Zazuelo, Zurita, A. (2013). Alimentos funcionales. Aproximación a una nueva alimentación. Inutcam (Instituto de Nutrición y Trastornos Alimentarios) Madrid. Recuperado el 23 de mayo de 2015 de [www.revistavirtualpro.com](http://www.revistavirtualpro.com)
- Baur, J. A.; Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Disco.* 5, 493-506.
- Bavaresco, L. (2003). Role of viticultural factors of stilbene concentrations of grapes and wines. *Drugs Exp. Clim. Res.* 29, 181-187.
- Bertacche, V.; Lorenzi, N.; Nava, D.; Pini, E.; Cínico, C. (2006). Host-guest interaction study of resveratrol with natural and modified cyclodextrins. *J. Incl. Phen. Macr. Chem.* 55. 279-287.
- Bik, E.M. (2009) Composition and function of the human-associated microbiota. *Nutr. Rev.* 67 (suppl. 2), s164-s171.

- Bitencourt, J.; Kluppel, M.; Matoso de Oliveira, V.; Domingos M.; Stulzer H. K.; Maissar, N.; Faria S.; Mainardes, R. M.; Farago, P. V. (2012) PHBV/PCL Microparticles for Controlled Release of Resveratrol: Physicochemical Characterization, Antioxidant Potential, and Effect on Hemolysis of Human Erythrocytes. The Scientific World Journal
- Bouayed, J.; Hoffmann, L.; Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccesability and potential uptake. Food Chemistry 128,14–21.
- Burns, J.; Gardner, P.T.; Yokota, T.; Ashihara, H.; Lean, M. E.; Crozier, A. (2002) Plant foods and herbal sources of resveratrol. J. Agric. Food Chem, 50, 3337-3340.
- Cantos, E.; García-Viguera, C.; Pascual-Teresa, S.; Tomás-Barberán, F.A. (2000). Effect of postharvest ultraviolet table grape, 48, 4606-4612.
- Carando, S.; Teissedre, P. L.; Waffo-Teguo, P.; Cabanis, J.C.; Deffieux, G.; Merilln, J.M. (1999). High-perfomance liquid chromatography coupled with fluorescence detection for the determination of trans-astringin in wine. J. Chromatogr. A., 849, 617-620.
- Counet, C.; Callemien, D.; Collin, S. (2006). Chocolate and cocoa: new sources of *trans*-resveratrol and *trans*-piceid. Food Chem, 98, 649-657.
- Damodaran, S.; Parkin, K. L.; Fennema, O.R. (2008) Fennema Química de los alimentos. Editorial Acribia 3ª Edición, Zaragoza.
- Davidov-Pardo, G.; McClements, J. D. M. (2014) Resveratrol encapsulation: designing delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues. Trends in Foods Science & Technology 38, 88-103.
- Davidov-Pardo, G.; Joye, I. J.; McClements (2015). Encapsulation of resveratrol in biopolymer particles produced using liquid antisolvent precipitation. Part 1: Preparation and characterization. Food Hydrocolloids 45, 309-316.
- Davidov-Pardo, G.; Joye, I. J.; McClements (2015).Encapsulation of resveratrol in biopolymer particles produced usingliquid antisolvent precipitation. Part 2: Stability and functionality. Food Hydrocolloids 49, 127-134.
- Docherty, J. J.; Fu, M. M.; Stiffer, S.; Limperos, R. J.; Pokaba, C. M.; CeLucia, A. L. (1999). Resveratrol inhibition of herpes simples replication. Antivi. Res. 43, 145-155.



- Escalona, S. E. (2004). Encapsulados de luteína-enocianina y su aplicación en alimentos. Tesis, Santiago.
- Esquivel Chávez, A. (2013). Desarrollo y caracterización de nanopartículas a base de zeína estabilizadas con pectina y  $\beta$ -lactoglobulina. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Elíes-Gómez, J. (2009). Efectos de los isómeros del resveratrol sobre la homeostasis del calcio y del óxido nítrico en células vasculares. Santiago de Compostela. Servicio de publicaciones e intercambio científico.
- Fauconneau, B.; Waffo Tegu, P.; Huguet, F.; Barrier, L.; Decendit, A.; Merillon, J. M. (1997). Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinífera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sciences*, 61, 21, 2103-2110
- Fernández, J. I.; Pinaluba, A. S.; (2007). Alimentos funcionales. Investigación de mercado. Recuperado el 23 de mayo de 2015 de [www. recercat,cat](http://www.recercat.cat)
- Galán, Gutiérrez, V. (2013). Encapsulación de resveratrol en  $\beta$ -glucanos. Aplicaciones a productos nutracéuticos. Tesis, Universidad de Palencia.
- Gambini, J.; López-Grueso, R.; Olaso-González, G.; Inglés, M.; Abdelazid, K.; El Alami, M.; Bonet-Costa, V.; Borrás, C.; Viña, J. (2013). Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Revista española de geriatría y gerontología*, 48, 2, 79-88.
- Hendler, S.S.; Rorvick, D. (2001) Alpha-lipoic acid. Eds, PDR for Nutritional Supplements. Medical Economics Company. Montvale, N.J.
- Heredia, A.; Davis. C.; Redfield. R. (2000). Synergistic inhibition of HIV-1 in activated and resting peripheral blood mononuclear cells monocyte-derived macrophages and selected drug-resistan isolates with nucleoside analogues combined with a natural product, resveratrol. *J. Acq. Immune. Deg. Synd.* 25, 246-255.
- Howitz, K. T.; Bitterman, K.J.; Cohen, H. Y.; Lamming, D. W.; Levu, S.; Wool, J. G. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Shaccaromyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425, 191-196.
- Hurtado-López, P.; Murdan, S. (2006) Zein microspheres as drug/antigen carriers. A study of their degradation and erosion, in the presence and absence of enzymes. *Journal of Microencapsulation* 23,3, 303-314.

- Irache, J. M. (2010). Micro- y nanoencapsulación de aditivos y otros compuesto de interés alimentario. Tecnología Farmacéutica. Universidad de Pamplona. 1er Congreso Nacional de Agroalimentación.
- Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G.O.; Slowing, K. V.; Thomas, C.F.; Beecher, C. W. W.; Fong, H. H. S.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D.; Mehta, R. G.; Moon, R. C.; Pezzuto, J. M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275, 218-220.
- Joye, I. J.; McClements, D.J. (2013) Production of nanoparticles by antisolvent precipitation for use in food systems. *Trends in Food Science & Technology* 34, 109-123
- Joye, I. J.; Davidov-Pardo, G.; McClements, D. J. (2015). Encapsulation of resveratrol in biopolymer particles produced using liquid antisolvent precipitation. Part 2: stability and functionality. *Food Hydrocolloids* 49, 127-149.
- Jürgens, B. M.; Fernández, Navarro, J. R.; Haek, Pérez, A.; Montes, Pérez, L.; López, Mielgo, V. (2007). Estudio sectorial de vigilancia tecnológica. Alimentos funcionales. Agencia de Innovación y Desarrollo de Andalucía IDEA.
- Kalantzi, L.; Goumas, K.; Kalioras, V.; Abrahamsson, B.; Dressman, J. B.; Reppas, C. (2006). Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharm. Res.*, 23, 165-175.
- Kim, S.; Kiong, Ng, W.; Dong, Y.; Das, S.; Tan, R. B. H. (2012). Preparation and physicochemical characterization of trans-resveratrol nanoparticles by temperature-controlled antisolvent precipitation. *Journal of food engineering*, 208, 37-42.
- Kosegarten-Conde, C. E.; Jiménez-Munguía, M. T. (2012) Temas selectos de Ingeniería de Alimentos 6, 2: 1-18.
- Lancheros, R. J.; Beleño, J. A.; Guerrero, C. A.; Godoy-Silva, R. D. (2014). PLGA nanoparticles production by emulsion and evaporation to encapsulate N-acetylcysteine (NAC). *Univ. Sci.* 19, 2, 161-168.
- Lesmes, U.; McClements, D.J. (2012). Controlling lipid digestibility: Response of lipid droplets coated by  $\beta$ -lactoglobulin-dextran Maillard conjugates to simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 26, 221-230.

- Li, Z.; Jiang, H.; Xu, C.; Gu, L. (2015). A review: using nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of phenolic phytochemicals. *Food Hydrocolloids* 43, 153-164.
- Lu, R.; Serrero, G. (1999) Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells. *J. Cell Physiol*, 179, 297-304.
- Lucas Abellán, C. (2009). Estudio de la complejación del resveratrol por diferentes tipos de ciclodextrinas. Tesis Universidad Católica de San Antonio, Murcia.
- Luo, Y.; Zhong, B.; Cheng, W. H.; Wang, Q. (2010). Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating. *Carbohydrate Polymers* 82, 942-951.
- Luo, Y.; Zhang, B.; Whent, M.; Yu, L.; Wang, Q. (2011). Preparation and characterization of zein chitosan complex for encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol, and its *in vitro* controlled release study. *Colloids and Surfaces* 85, 145-152.
- Luo, Y.; Teng, Z.; & Wang, Q. (2012). Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60 (3), 836–843.
- Luo, Y. C.; Wang, T.T.Y.; Teng, Z.; Chen, P.; Sun, J. H.; Wang, Q. (2013) Encapsulation of indole-3-carbinol and 3,3'-diindolymethane in zein/carboxymethyl chitosan nanoparticles with controlled release property and improved stability. *Food Chemistry*, 139 (1-4), 224-230.
- Lyons, M. M.; Yu, C.; Toma, R.B.; Cho, S.Y.; Reiboldt, W.; Lee, J. (2003) Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries. *J. Agric. Food Chem*, 51, 5867-5870.
- Mahady, G. B.; Pendland S. L. (2000). Resveratrol inhibits the growth of *Helicobacter pylori* in vitro. *Am. J. Gastroenterol*, 95, 1849.
- Markman, G.; Livney, Y. D. (2011) Maillard-conjugate based core-shell co-assemblies for nanoencapsulation of hydrophobic nutraceuticals in clear beverages. *Food & Function*, 3, 262-270.
- McClements, D. J. (2005). *Food emulsions: Principles, practice, and techniques*. CRC Press INC.

- McClements, D. J.; Decker, E. A.; Park, Y.; Weiss, Y. (2009) Structural Design Principles for Delivery of Bioactive Components in Nutraceuticals and Functional Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49, 6 577-606.
- Minekus, M.; Alming, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Carrière, F.; Boutrou, R.; Corredig, M.; Dupont, D.; Dufour, C.; Egger, L.; -golding, M.; Karakaya, S.; Kirkhus, B.; Le Feunteun, S.; Lesmes, U.; Macierzanka, A.; Mackie, A.; Marze, S.; McClements, D. J.; Menard, O.; Recio, I.; Santos, C.N.; Singh, R.P.; Vegarud, G. E.; Wickham, M. S. J.; Weitschies, W.; Brodkorb, A. (2014) A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*, 5, 1113-1124.
- Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Sanchez-Patan, F., Llorach, R., Garrido, I., Gomez-Cordoves, C., Andres-Lacueva, C., Bartolome, B. (2010). Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food Funct.* 1: 233-253.
- Morán, J. (2010). Tendencias actuales en alimentos funcionales: mercado y legislación. *Food Consulting-San Antonio Technologies*.
- Ng, J. C.; Juhasz, A. L.; Smith, E.; Naidu, R. (2009). Contaminant bioavailability and bioaccessibility - Part 2: Guidance for industry. *CRC for contamination Assessment and Remediation of the Environment. Technical Reports n° 14*.
- Oliver, C. M.; Melton, L. D.; Stanley, R. A. (2006). Creating Proteins with Novel Functionality via the Maillard Reaction: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46, 337-350.
- Pan, X.; Mu, M.; Hu, B.; Yao, P. Jiang, M. (2006) Micellization of casein-graft-dextran copolymer prepared through Maillard reaction. *Byopolimers*, 81, 1, 29-38.
- Parra Huertas, R. A. (2010). Microencapsulación de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 63, 2, 5669-5684.
- Parris, N.; Cooke, P. H.; Kicks, K. B. (2005). Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4788-4792.
- Park, S. J.; Jeon, S. Y.; Yeo, S. D. (2006). Recrystallization of a pharmaceutical compound using liquid and supercritical antisolvents. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45, 2287-2293.

- Patel, A. R.; Bouwens, E. C. M.; Velikov, K. P. (2010). Sodium caseinate stabilized zein colloids particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 12497-12503.
- Pedroza, R. (2002) Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los Procesos para la Microencapsulación de Alimentos para Larvas de Especies Acuícolas. *Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, México.
- Podaralla, S.; Perumal, O. (2012). Influence of formulation factors on the preparation of zein nanoparticles. *Aaps Pharmscitech*, 13, 919-927.
- Ramos Talma, M. A. (1995). Aplicación de técnicas enzimáticas de digestión *in vitro* a la valoración nutritiva de piensos de conejos. Tesis Universidad Complutense de Madrid.
- Rius, C.; Abu-Taha, M.; Hermenegildo, c.; Piqueras, L.; Cerda-Nicolas, J. M.; Issekutz, A. C.; Estan, L.; Cortijo, J.; Morcillo, E. J.; Orallo, F.; Sanz, M. J, (2010). Trans-but Not-Cis-Resveratrol Impairs Angioteenssin-II-Medaited Vascular Inflammation throught Inhibition of NF-kappa B Activation and Peroxisome Proliferator-Activated-Receptor-gamma Upregulation. *Journal of Immunology*, 185,6, 3718-3727.
- Ronquillo de Jesús, E. (2009). Coenzima Q10 nanoencapsulado en biopolímeros por el método de desplazamiento de solvente. Tesis. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. México, D.F.
- Romero-Pérez, A. I.; Ibern-Gomez, M.; Lamuela-Raventós, R.M.; De La Torre-Boronat, M. C. (1999). Piceid, the major resveratrol derivate in grape juices. *J. Agric. Food Chem*, 47, 1533-1536.
- Romero-Pérez, A.; Lamuela-Raventós, R. M.; Waterhouse A. I.; De la Torre-Boronat, M. C. (1996). Levels of *cis*- and *trans*-resveratrol and their glucosides in White and rose *Vitis vinífera* wines from Spain. *J. Agric. Food Chem*, 44, 2124-2128.
- Ruch, F.; Matijevic, E. (2000). Preparation of micrometer size Budesonide particles by precipitation. *Joruenal of Colloid and Interface. Science* 229, 207-211.

- Ruiz, Roca, B. (2009). Propiedades antioxidantes de los productos de la Reacción de Maillard y su influencia en la absorción de hierro y cobre. Relación con la capacidad quelante de metales. Tesis Universidad de Granada-CSIC.
- Selma, M.V., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. *J. Agric. Food Chem.* 57: 6485-6501.
- Sessa, M.; Tsao, R.; Liu, R.; Ferrari, G.; Donsi, F. (2011) Evaluation of the stability and antioxidant activity of nanoencapsulated resveratrol during in vitro digestión. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12352-12360.
- Shah, B.; Davidoson, P. M.; Zhongg, Q. (2012). Encapsulation of eugenol using Maillard-tyoe conjugates to frm transparent and heat stable nanoscale dispersions. *Food Science and Techonology*, 49, 1, 139-148.
- Shahidi, F.; Han, X.Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 501-547.
- Shukla, R.; Cheryan, M. (2001). Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*, 13, 171-192.
- Stervbo, U.; Vang, A.; Bonnesen, C. (2007). A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chem*, 101, 449-457.
- Tavares, L., Figueira, I., McDougall, G. J.; Vieira, H. L.; Stewart, D.; P. M. Alves, P. M.; Ferreira, R. B.; Santos, C. N. (2013). Neuroprotective effects of digesed polyphenols from wild blackberry species. *European Journal of Nutrition*, 52, 225–236.
- Tokusoglu, O.; Unal, M. K.; Yemis, F. (2005). Determination of the phytoalexin resveratrol (3, 5, 4'- trihidroxystilbene) in peanuts and pistachios by high perfomance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *J. Agric. Food Chem*, 53, 5003-5009.
- Tredici, G.; Miloso, M.; Nicolini, G.; Gabalbiati, S.; Cavaletti, G.; Bertelli, A. (1999). Resveratrol MAP kinase and neuronal cells: might wine be a neuroprotectant? *Drugs Exp. Clin. Res.* 25, 99-103.
- Unzue Pozas, A. (2011). Innovación de la industria agroalimentaria: Estudio de aceptación de los consumidores antes los alimentos funcionales en la comarca de Pamplona. Universidad Pública de Pamplona.

- Walle, T.; Hsieh, F.; DeLegge, M.; Oatis, J. E.; Walle, U. K. (2004) Drug Metabolism And Disposition, 32, 12, 1377-1382.
- Wang, Y.; Catana, F.; Yang, Y.; Roderick, R.; van Breemen, R. B. (2002). An LC-MC method for analysing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. J. Agric. Food Chem, 50, 431-435.
- Williamson, G., Clifford, M.N. (2010). Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity. Br. J. Nutr. 104: s48-s66.
- Yi, J.; Lam, T. I.; Yokoyama, W.; Cheng, L. W, Zhong, F. (2014). Controlled release of  $\beta$ -carotene in  $\beta$ -lactoglobulin-dextran-conjugated nanoparticles *in vitro* digestion and transport with Caco-2 monolayers. J. Agric. Food. Chem. 62, 8900-8907.
- Zhao, H.; Wang, J.X.; Wang, Q.A.; Chen, J. F.; Yun, J. (2007). Controlled liquid antisolvent precipitation of hydrophobic pharmaceutizal nanoparticles in a microchannel reactor. Industrial & Engineering Chemistry Research, 46, 8229-8235.
- Zhong, Q.; Jin, M. (2009). Zein nanoparticles produced by liquid-liquid dispersión. Food Hydrocolloids 23, 2380-2387.
- Zhou, J.; Zhou, M.; Yang, F. F.; Liu, C. Y.; Pan, R. L.; Chang, Q.; Liu X. M.; Liao, Y. H. (2015) Involvement of the Inhibition of Intestinal Glucuronidation in Enhancing the Oral Bioavailability of Resveratrol by Labrasol Containing Nanoemulsions. Mol. Pharmaceutics, 12, 1084–1095
- Zou, T.; Li, Z.; Percival, S.S.; Bonard, S.; Gu, L. (2012). Fabrication characterization and cytotoxicity evaluation of canberry procyanidins-zein nanoparticles. Food Hydrocolloids 27, 293-300.